

JP04/14308

22.09.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 9月22日
Date of Application:

出願番号 特願2003-330569
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-330569]

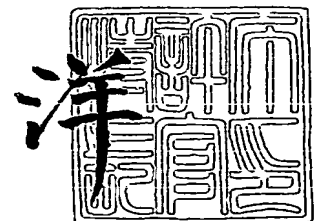
出願人 独立行政法人理化学研究所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 RJH15-067P
【提出日】 平成15年 9月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区北寺尾 4-9-7 B-106
 【氏名】 出村 拓
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都江東区越中島 1-3 越中島住宅 17-407
 【氏名】 福田 裕穂
【特許出願人】
 【識別番号】 000006792
 【氏名又は名称】 理化学研究所
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096183
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石井 貞次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100118773
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤田 節
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015244
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9503608

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

任意のアダプター配列、スパーサー配列、及びアダプター配列の逆位配列からなる標的配列の逆位反復配列調製用カセットコンストラクト。

【請求項 2】

スパーサー配列が、イントロン配列である請求項 1 記載のカセットコンストラクト。

【請求項 3】

一方又は両方の末端に標的配列の結合のための前処理がなされた請求項 1～2 いずれか 1 項記載のカセットコンストラクト。

【請求項 4】

一方又は両方の末端に標的配列が結合してなる請求項 1～3 の何れか一項に記載のカセットコンストラクト。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のカセットコンストラクトを鋳型として、標的配列のどちらか一方の末端の配列に由来する単一のプライマーを用いた PCR を行い、標的配列の逆位反復構造を含む増幅産物を調製する方法。

【請求項 6】

請求項 4 記載のカセットコンストラクトを鋳型として、PCR により標的配列の逆位反復構造を調製する方法。

【請求項 7】

請求項 4 記載のカセットコンストラクトを組み込んだプラスミド。

【請求項 8】

請求項 7 記載のプラスミドを鋳型に、PCR を行い、標的配列の逆位反復構造を調製する方法。

【請求項 9】

PCR が非対称 PCR である請求項 8 記載の標的配列の逆位反復構造を調製する方法。

【請求項 10】

用いるプライマーの一方の 3' 末端がスパーサー部分を含む請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 5, 6, 8, 9 又は 10 いずれか 1 項記載の方法で調製された標的配列の逆位反復構造を含む発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

【書類名】明細書

【発明の名称】効率的なDNA逆位反復構造の調製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子機能解析手段として用いられ、又機能改変した変異体動植物の作成に用いることができるRNA干渉の技術分野に関する。

更に、本発明は、RNA干渉に用いる標的遺伝子DNA断片の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を効率的に調製する方法及びそのためのカセットコンストラクトを提供する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子の転写後の制御方法としては、従来から、アンチセンス法（非特許文献1）及びセンス法（非特許文献2）が知られている。しかしながら、アンチセンス、及びセンス法両者とも、形質転換体中での遺伝子制御の効率が十分なものではなかった。

【0003】

近年になり、まず、線虫（*Caenorhabditis elegans*）で、二本鎖RNA（dsRNA）が、遺伝子の転写後発現の低下に、アンチセンスRNA、及びセンスRNAのいずれよりも効果的であることが見出された。この現象は、RNAiと呼ばれている。RNAiは、RNase III核酸分解酵素ファミリーの一種であるDicerと名付けられた酵素がdsRNAをsmall interfering RNAまたはsiRNAと呼ばれる小さな断片に分解するところから始まるといわれている。

【0004】

ところで、哺乳類では、ごく微量のdsRNAでも細胞内に導入すると、インターフェロンが生成し、アポトーシスを引き起こすといわれ、そのため、アポトーシスを引き起こさない手法が研究された。dsRNAのDicerによる分解により生じる短いdsRNAであるsiRNAは、アポトーシスを引き起こさず、転写後制御ができることが発見された。更に、線虫の幾つかの遺伝子がヘアピン構造のRNAをコードしており、他の遺伝子を制御しているとの知見から、siRNAに代わるものとして、ヘアピン構造に折り畳んだ小さなRNAで特定遺伝子の機能を阻害できるか研究された。その結果、short hairpin RNA(shRNA)は、siRNAと同程度に遺伝子の発現を制御できることが見出された。

【0005】

転写後の遺伝子発現の低下には、更に、効率的に転写後発現を抑制する方法として、標的遺伝子のDNA断片が逆位反復構造（逆向きの繰り返し構造）をとるキメラ遺伝子を用いる方法（非特許文献3）が知られている。

【0006】

この標的遺伝子DNA断片の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を生体内に安定的に導入し、それによって生体内で産生されるdsRNAを引き金とする配列特異的な内性RNAの分解方法（RNA干渉）は、遺伝子機能の有効な解析手法として、その利用が広がっている。

また、標的遺伝子DNA断片の挿入に相同的遺伝子組換えを応用した技術が報告されている（特許文献1、非特許文献4）。

【0007】

【特許文献1】米国特許公開20030049835号

【非特許文献1】Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.83 5372-5376（非特許文献3中引用文献）

【非特許文献2】Plant Cell Vol.2 p.291（非特許文献3中引用文献）

【非特許文献3】The Plant Journal Vol.33, p.793-800

【非特許文献4】Plant J., 27, 581-590, 2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ところで、従来の標的遺伝子DNA断片（標的配列）の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子の作製技術では、任意の、主にはプラスミドベクター上の2箇所に標的配列をセンス方向

とアンチセンス方向、あるいは、アンチセンス方向とセンス方向に、個別に挿入する必要がある。

【0009】

一般的に、この標的配列の挿入は制限酵素によるDNAの切断反応とリガーゼによる結合反応によって行われるが、標的配列をセンス方向とアンチセンス方向あるいはアンチセンス方向とセンス方向に正確に挿入するためには、ベクター上の2箇所の標的配列挿入部位にそれぞれ独立した制限酵素認識配列が存在し、標的配列にも標的配列挿入部位に対応する制限酵素認識配列が存在しなければならない。

【0010】

そのため、標的配列の塩基配列によっては画一的な処理での標的配列の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子の作製が困難な場合があり、網羅的な遺伝子機能の解析には適していない。

【0011】

また、標的配列の挿入に相同的遺伝子組換えを応用した技術が報告されている (Wesley et al., Plant J., 27, 581-590, 2001; 米国特許公開20030049835)。この技術では、標的配列の両端に一对の相同的遺伝子組換え酵素の認識配列を付与する必要がある、標的配列の両末端の塩基配列に特異的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRを行うか、ベクター上の一对の相同的遺伝子組換え酵素認識配列の間に標的配列を挿入しなければならない。そして、この相同的遺伝子組換え酵素の認識配列が付与された標的配列を用いて逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を作製するためには、標的配列ごとに個別に相同的遺伝子組換え反応を行わなければならない。

【課題を解決するための手段】

【0012】

はじめに、任意のスペーサー配列を挟んで任意の塩基配列（アダプター配列）及び当該アダプター配列の逆位に反復した塩基配列（逆位アダプター配列）が配置したDNA構築物であるカセットコンストラクト、又は当該カセットコンストラクトを組み込んだプラスミドベクターを作製する。次に、カセットコンストラクトの何れか一方又は両方の末端に標的遺伝子のDNA断片（標的配列）を結合させる、又は当該プラスミドベクター上のカセットコンストラクトの何れか一方の末端の外側に標的配列を挿入する。さらに、標的配列を結合した当該カセットコンストラクトを鋳型とし、標的配列の何れかの末端部分に対応する一種類のプライマーを用いてPCRを行う、又は、標的配列が挿入された当該プラスミドベクターを鋳型として、上の標的配列挿入部位のさらに外側のプラスミドベクターの塩基配列に対応するプライマー（プライマーA）および標的配列挿入部位とは逆側のアダプター配列または逆位アダプター配列とスペーサー配列の一部を含む塩基配列に対応するプライマー（プライマーB）を用いてPCRを行う。このPCRの際に生成される一本鎖のPCR産物の一部でアダプター配列と逆位アダプター配列の部分が一時的に同一分子内でアニーリングし投げ縄構造をとるか、2分子間で相互にアニーリングし、さらに、引き続いて起こる伸長反応とPCRにより、標的配列が逆位反復構造をとるキメラ遺伝子が二本鎖のPCR産物として得られる。（図1～5参照）

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、はじめに、任意のスペーサー配列を挟んで任意の塩基配列（アダプター配列）及び当該アダプター配列の逆位に反復した塩基配列（逆位アダプター配列）が配置したDNA構築物であるカセットコンストラクト、又は当該カセットコンストラクトを組み込んだプラスミドベクターを調製しておけば、標的遺伝子の塩基配列に依存することなく、効率的に、同一の手法で、図1に示すような標的配列の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を効率的に調製することができる。

【0014】

今後、RNAi法により、種々の遺伝子を大量にノックアウトする場合には、同一手法で、簡便に標的配列の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を作成することが必須であるところ

、本件発明は、これを可能とする、極めて有意義な発明である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

1. カセットコンストラクト

まず、本発明は、任意の配列（スパーサー配列、または介在配列）を挟んでこれとは別の任意の塩基配列（アダプター配列）及び当該アダプター配列の逆位に反復した塩基配列（逆位アダプター配列）が配置したDNA構築物（カセットコンストラクト）を包含する。（図2～3参照）

【0016】

1-1. スパーサー配列（介在配列）

スパーサー配列は、標的配列とアダプター配列とは関連しない（試験管内および生体内で標的配列またはアダプター配列と相補的に結合しない）塩基配列でなければならない。スパーサー配列は（一本鎖DNAまたは一本鎖RNAの状態で同一分子内の逆位に反復したアダプター配列同士が容易に相補的に会合するように、また、大腸菌内で容易に増幅するように）好適には10ヌクレオチド以上の塩基長で、具体的には、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質（GFP）や大腸菌の β -グルクロニダーゼ（GUS）の構造遺伝子の部分断片、さらに好適には、（植物やショウジョウバエなどの生体内でスプライシングにより取り除かれるように）イントロン配列、具体的には、シロイヌナズナの脂肪酸不飽和化酵素（FAD2）遺伝子やショウジョウバエのABCトランスポーター遺伝子のイントロンを挙げることができる。

【0017】

1-2. アダプター配列

アダプター配列および逆位アダプター配列は、標的配列、スパーサー配列、さらには用いるプラスミドベクターの塩基配列とは関連しない（試験管内および生体内で、標的配列、スパーサー配列、さらには用いるプラスミドベクターの塩基配列と相補的に結合しない）塩基配列で、好適には、通常のPCRのアニーリング条件でアダプター配列と逆アダプター配列が会合できる配列を用いる。具体的には、通常18～28ヌクレオチド長で、GC含量が50～60%、 T_m 値が55～80℃になるように設計する。さらに具体的には、Koらによるローン・リンカーの一方の配列をアダプター配列とし、その相補配列を逆アダプター配列として用いることができる。（Ko, M. S. H. ら, *Nucleic Acids Res.*, 18, p4293-4294, 1990）

【0018】

2-1. カセットコンストラクトの調製

上記カセットコンストラクトは、周知の手段で、調製することができる。好適には、まず、図2に示されるように、両端に平滑末端を有するスパーサー配列を調製する。さらに、その両端にアダプター配列および逆アダプター配列として、ローン・リンカーと呼ばれる非接着性の突出末端と平滑末端を持ったリンカー配列を結合することができる。ローン・リンカーとしては、例えば、LL-Sse8387Iとして、LL-Sse8387IA（5'-GAGATATTACCTGCAGGTACTC-3'）及びLL-Sse8387IB（5'-GAGTACCTGCAGGTAAATAT-3'）、あるいは、LL-SalIとして、LL-SalIA（5'-ATTGACGTCGACTATCCAGG-3'）及びLL-SalIB（5'-CCTGGATAGTCGACGTC-3'）を用いることができる（Ko, M. S. H. ら, *Nucleic Acids Res.*, 18, p4293-4294, 1990）。LL-Sse8387IA, B、あるいは、LL-SalIA, Bをリン酸化し、アニーリングさせる。このアニーリングしたLL-Sse8387I、あるいは、LL-SalIを平滑末端末端を有するスパーサー配列に結合させる。このように調製されたカセットコンストラクトはPCR法により、例えば、LL-Sse8387I、あるいは、LL-SalIAをプライマーとして増幅することができる。

【0019】

上記カセットコンストラクトの別な調製方法として、周知の手段で、プラスミドベクター上にカセットコンストラクトを構築し、カセットコンストラクト部分を制限酵素反応な

どによって切り出すか、PCR法によって増幅する方法を採用することができる。プラスミドベクター上にカセットコンストラクトを構築する方法としては、例えば、図3Aに示されるように、スパーサー配列を挿入したプラスミドベクター上のスパーサー配列の両端にアダプター配列と逆アダプター配列を、周知の手段、すなわち制限酵素反応とライゲーション反応で順次挿入することができる。或いは、図3Bに示されるように、アダプター配列と逆位アダプター配列が連続し、その中央部に任意の制限酵素の認識配列が設けられたオリゴヌクレオチド及びその相補鎖からなるオリゴヌクレオチドを調製し、これらをアニーリングさせた逆位反復アダプター配列を任意のプラスミドベクターに組み込み、その後、上記任意の制限酵素を用いて逆位反復アダプター配列の中央部にスパーサー配列を挿入することができる。上記制限酵素としては、アダプター配列、プラスミドベクター、スパーサー配列には認識部位が存在しない制限酵素を用いることができるが、好適には、挿入するスパーサー配列の両末端と付着末端となる制限酵素を用いることができる。上記プラスミドベクターとしては、上記オリゴヌクレオチドの3'末端に1ヌクレオチドのアデニン(A)を付加しておけば、好適には、TAクローニング用のプラスミドベクター、具体的には、pGEM-T Easy Vector (Promega社) などを用いることができる。

【0020】

2-2. カセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターの調製

カセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターは、周知の手段で調製することができる。例えば、図3に示されたプラスミドベクター3A及びプラスミドベクター3Bのカセットコンストラクトに近接したプラスミドベクター上に標的配列を挿入できる制限酵素認識部位を設けておくことにより、これらをカセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターとして用いることができる。或いは、図4で示したように2-1で調製したカセットコンストラクトを任意のプラスミドベクターに組み込むときにカセットコンストラクトに近接したプラスミドベクター上に平滑末端を生じる制限酵素認識部位を設けておくこと等により、標的配列を簡単に挿入できる標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターを設計することができる。

【0021】

又、カセットコンストラクトを組み込んだプラスミドベクターは、任意の動植物のcDNA、好適には均一化したcDNAを基にした多種類の遺伝子DNA断片が逆位反復構造をとるキメラ遺伝子のプールの調製に用いることができる。

【0022】

2-3. 標的配列のカセットコンストラクトへの結合及びカセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターへの挿入

標的配列は、[特許文献1]に従い選択することができる。例えば、標的配列は、表現型の発現を抑制しようとする標的となる遺伝子のDNA断片を用いることができる。標的配列の長さは10ヌクレオチド長から標的遺伝子の表現型発現が抑制されるのに十分なヌクレオチド長、好適には、最低19ヌクレオチド長、最低21ヌクレオチド長、最低25ヌクレオチド長、最低約50ヌクレオチド長、最低約100ヌクレオチド長、最低約150ヌクレオチド長、最低約200ヌクレオチド長又は最低約500ヌクレオチド長で、可能ならば約1000ヌクレオチド長の標的配列を用いることができる。

【0023】

標的配列は、カセットコンストラクトの何れか一方又は両方の末端に結合される。このとき、好適には、標的配列として両末端が平滑でリン酸化されていないものを用いることができる。このような標的配列は、5'末端が脱リン酸化されたプライマーのセットと3'末端に(dA)を付加しないタイプの耐熱性DNAポリメラーゼを用いたPCRを行う、或いは、通常の耐熱性ポリメラーゼを用いてPCRを行った後3'末端の(dA)突出を周知の手段で除去し、更にPCR産物を脱リン酸化する、或いは、5'末端がリン酸化されたプライマーのセットと3'末端に(dA)を付加しないタイプの耐熱性DNAポリメラーゼを用いてPCRを行った後PCR

産物の5'末端を脱リン酸化することで、調製することができる。

【0024】

標的配列は、カセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターのアダプター配列または逆位アダプター配列の外側に挿入される。好適には、プラスミドベクター上のカセットコンストラクトの一方の外側にのみ認識配列が存在する制限酵素を用いて、カセットコンストラクトの一方の外側に、標的遺伝子のDNA断片を挿入する標的遺伝子のDNA断片を挿入する。更に好適には、カセットコンストラクトのいずれか一方の直近の外側に標的遺伝子を挿入する。例えば、平滑末端を形成する制限酵素の認識配列がアダプター配列の外側に存在する場合は、当該制限酵素で、プラスミドベクターを切断し、平滑末端を有する標的配列とリガーゼで結合させることができる。もちろん、アダプター配列の外側に他の制限酵素認識配列が存在する場合、プラスミドベクターと標的配列を同じ制限酵素で処理して、付着末端同士で結合させればよい。

【0025】

2-4. カセットコンストラクトの修飾

標的配列のカセットコンストラクトへの結合を容易にするため、また、標的配列を結合したカセットコンストラクトを鋳型としたPCRによる標的配列の逆位反復構造の作製を容易するために、カセットコンストラクトの一方又は両方の末端に修飾を施すことができる。

。このような標的配列結合容易化カセットコンストラクトとしては、次のものがある。

【0026】

図6に示す標的配列結合容易化カセットコンストラクト1（以下CC1と略）は、両5'末端をリン酸化することによって、両末端が脱リン酸化された標的配列の結合が可能になるよう設計されている。これは3'末端に(dA)を付加しないタイプの耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばKOD-Plus- (TOYOBO社)を用いれば、容易に調製できる。図7に示す標的配列結合容易化カセットコンストラクト2 (CC2) は一方の末端のみをリン酸化することでカセットコンストラクトの一方にしか両末端が脱リン酸化された標的配列が結合しないように設計したものである。

【0027】

また、図8中の標的配列結合容易化カセットコンストラクト (CC3) は、CC1の両3'末端に(dT)を付加することによって通常の3'末端に(dA)を付加する耐熱性DNAポリメラーゼで増幅した両末端が脱リン酸化された標的配列が結合するように設計されている。

【0028】

図9中の標的配列結合容易化カセットコンストラクト (CC4) は、一方の3'末端のみに(dT)の付加とリン酸化を施すことによってカセットコンストラクトの一方にしか通常の3'末端に(dA)を付加する耐熱性DNAポリメラーゼで増幅した両末端が脱リン酸化された標的配列が結合しないように設計されている。

【0029】

図10中の標的配列結合容易化カセットコンストラクト (CC5) は一方の3'末端のみにトポイソメラーゼI (Invitrogen社)の付加とリン酸化を施すことによってカセットコンストラクトの一方にのみ標的配列が容易に結合するように設計されている。

【0030】

図11中の標的配列結合容易化カセットコンストラクト (CC6) は一方の3'末端のみに(dT)とトポイソメラーゼIの付加とリン酸化を施すことによってカセットコンストラクトの一方にのみ通常の3'末端に(dA)を付加する耐熱性DNAポリメラーゼで増幅した両末端が脱リン酸化された標的配列が結合するように設計されている。

【0031】

2-5. カセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターの修飾

カセットコンストラクトが組み込まれた標的配列の逆位反復構造調製用プラスミドベクターへの標的配列の挿入を容易にするために、逆位反復構造調製用プラスミドベクター

制限酵素等で開裂し、その末端に、標的配列の挿入を容易化する処理を施すことができる。具体的には、図12中のpRNAi/blantのように開裂末端を平滑化する、図12中のpRNAiTのように開裂末端の3'末端に(dT)を付加する、図12中のpRNAiTTPのように開裂末端の3'末端にトポイソメラーゼIを付加する、図12中のpRNAiTTPのように開裂末端の3'末端に(dT)とトポイソメラーゼIを付加する、ことができる。

【0032】

3. キメラ遺伝子の増幅

図6～11に示すように標的配列がカセットコンストラクトの何れか一方又は両方の末端に結合したDNA生成物を鋳型として、任意の遺伝子増幅法により、特に好適には、標的配列の一方の末端に特異的なプライマー(Primer IまたはII)のみを用いたPCR法により、標的配列がカセットコンストラクトを挟んで逆位反復構造をとるキメラ遺伝子を調製することができる。具体的には、熱変性による一本鎖DNA構造物の生成、Primer IまたはIIを用いたPCR、を行えばよい。また、これら図6～11では標的配列に特異的なプライマーを用いたPCRの例を示したが、周知の手段でcDNAやゲノムDNAのDNA断片の両端に相互に異なるリンカー(またはアダプター)を結合させることができ、この場合、標的配列に特異的なプライマーの代わりにリンカー(またはアダプター)部分のプライマーセットを使うことができる。

【0033】

また、標的配列がカセットコンストラクトのどちらかの外側の一方に挿入されたプラスミドベクターを鋳型として用いて、任意の遺伝子増幅法により、特に好適には、非対称PCR法(一方のプライマーを他方のプライマーに対して過剰に使用して行うPCR、標準技術集「核酸の増幅及び検出」4-1-2-6 非対称的増幅)により、標的配列がカセットコンストラクトを挟んで逆位反復構造をとるキメラ遺伝子を調製することができる。プライマーとしては、(1)挿入した標的配列に対し当該カセットコンストラクトとは反対側のプラスミドベクター部分、及び(2)アダプター配列又は逆位アダプター配列のいずれか一方であって当該標的配列から遠い方の配列およびそれに隣接するスペーサー配列の一部を含むように設計されたオリゴヌクレオチド、のセットを用いる。非対称PCR法を用いる場合には、上記(1)のプライマーを(2)のプライマーよりも、好適には5倍以上、あるいは10倍以上、あるいは約100倍以上使用することができる。

【0034】

なお、キメラ遺伝子の増幅後に種々のベクターへの組み込みが容易になるように、プライマーの5'側には数塩基の任意の配列を含んでいてもよい。

【0035】

上記の非対称PCRを行うことにより、標的配列、アダプター配列、スペーサー配列、逆位アダプター配列が順次連結した一本鎖のPCR産物が過剰に増幅される。この一本鎖のPCR産物に含まれるアダプター配列と逆位アダプター配列の部分が一時的に同一分子内でアニーリングし投げ縄構造をとるか、2分子間で相互にアニーリングし、さらに、引き続いて起こる伸長反応と上記プライマー(1)のみによるPCR増幅により、標的配列が逆位反復構造をとるキメラ遺伝子が二本鎖のPCR産物として得られる。

【0036】

また、非対称PCRを行わずに標的配列が逆位反復構造をとるキメラ遺伝子が二本鎖のPCR産物を得ることができる。例えば、通常のPCR(対称PCR)を行い、その後、上記プライマー(1)から伸長した一本鎖のPCR産物、すなわち、標的配列、アダプター配列、スペーサー配列、逆位アダプター配列が順次連結した一本鎖のPCR産物のみを回収して、上記プライマー(1)のみによるPCRを行うと、この一本鎖のPCR産物に含まれるアダプター配列と逆位アダプター配列の部分が一時的に同一分子内でアニーリングし投げ縄構造をとるか、2分子間で相互にアニーリングし、さらに、引き続いて起こる伸長反応と上記プライマー(1)のみによるPCR増幅により、標的配列が逆位反復構造をとるキメラ遺伝子が二本鎖のPCR産物として得られる。

【0037】

4. 発現ベクターへの組み込み・形質転換体の作成

上記の標的配列の逆位反復構造を含む増幅物は、適宜の発現ベクターに組み込むことができる。

組み込まれた発現ベクターは、宿主細胞、例えば、植物細胞に導入することができる。

以下に実施例により具体的に説明する。

ただし、本発明、本実施例により限定されるものではない。

[実施例]

【実施例 1】

【0038】

本発明による、標的遺伝子のDNA断片（標的配列）の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子作製の一実施例として、図1に示すキメラ遺伝子を以下の工程(1)―(3)の通り作製した。

【0039】

(1) pRNAiの作製

中央にスパーサー配列を挿入できる塩基配列を有し、逆位反復構造をもつオリゴヌクレオチドを逆位反復アダプター配列、すなわち、連続した任意のアダプター配列とその逆位アダプター配列を合成する。ここでは、中央に制限酵素SmaIの認識配列CCCGGGを有し、3'末端にAを付与したオリゴヌクレオチド（5'—GAGATATTACCTGCA GGTACTCACCCGGGTGAGTACCTGCAGGTAATATCTCA—3'）を合成し、このオリゴヌクレオチドをアニーリング後（図13B）、プラスミドベクターにクローニングした。ここでは、アニーリングにより両3'末端に(A)突出ができるため、これを市販のTAクローニングベクターpGEM-T Easy Vector (Promega社)（図13A）にクローニングし、pGEM-Tを作製した（図13C）。さらに、クローニングした逆位反復配列の中央にスパーサー配列を挿入した（図13D～F）。ここでは、制限酵素SmaIによりpGEM-Tの逆位繰返し配列の中央を切断し（図13D）、スパーサー配列としてシロイヌナズナFAD2遺伝子のイントロン配列を含むDNA断片（図13E、配列番号4）をPCRにより増幅後、T4 DNAリガーゼにより挿入し、pGEM-Tを作製した（図13F）。続いて、カセットコンストラクトを含む領域をpGEM-T Easy Vector上のオリゴヌクレオチドのクローニングサイトの両側に認識配列が存在する制限酵素EcoRIで切り出し、pBluescript II KSプラスミドベクター(Stratagene社)のEcoRI開裂部位にT4 DNA ligaseを用いて挿入連結し、カセットコンストラクトのアダプター配列側の外側に制限酵素EcoRVの認識配列が存在するpRNAiを作製した（図14）。続いて、周知の手段でpRNAiの塩基配列を確認した。

【0040】

(2) 標的遺伝子DNA断片（標的配列）のpRNAiへの挿入

pRNAi上のカセットコンストラクトの一方の外側に標的配列を挿入した。ここでは、pGEM-T Easy Vector (Invitrogen社)にクローニングされたヒヤクニチソウのレセプター型プロテインキナーゼ遺伝子のcDNA (Z8755, DDBJ Accession No. AU293996, T. Demura他: PNAS, 99, 15794-15799)の一部をアダプター配列の外側に挿入した。まず、ベクター上のクローニングサイトの外側の配列に対応するプライマーのセット、Forward primer (TGTA A A A C G A C G G C C A G T) およびReverse primer (C A G G A A A C A G C T A T G A C C)、を用いてPCRによりZ8755のcDNAを含むDNA断片を増幅し、制限酵素AfaIを用いて平滑末端をもつ部分DNA断片を調製した（配列番号5）。これをpRNAiの制限酵素EcoRV開裂部位にT4 DNA ligaseを用いて挿入連結した（図15）。

【0041】

(3) 標的配列の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子の作製

標的配列を挿入したプラスミドを鋳型として、標的配列挿入部位のすぐ外側のベクターの塩基配列をもとにしたプライマー（プライマーA）およびスパーサーの一部とDNA挿入部位とは逆側の逆位反復構造を含む塩基配列をもとにしたプライマー（プライマーB）を用いてPCRを行った。この際、プライマーAをプライマーBに比べて過剰に用いることで、標的配列がカセットコンストラクトを挟んで逆位反復構造をとる二本鎖のPCR産物がつくら

れた。この現象は、PCRの際に生成される一本鎖のPCR産物の一部でアダプター配列と逆位アダプター配列の部分が一時的に同一分子内でアニーリングし投げ縄構造をとるか、2分子間で相互にアニーリングし、さらに、引き続いて起こる伸長反応とPCRにより引き起こされると考えられる。ここでは、図16に示したように、プライマーAとして、pBluescript II KSの制限酵素EcoRV認識部位の直近の外側の塩基配列（CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAT）とその5'末端にpENTR/D TOPO vector（Invitrogen社）にクローニングするための配列（CA）を付加したオリゴヌクレオチドRNAiF（CACCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAT）を0.6 μ mol/lの最終濃度で、プライマーBとしてスパーサーの3'末端（CACCC）と逆位アダプター配列の塩基配列（GGGTGAGTACCTGCAGGTAATAATCT）の相補鎖をもとに合成したオリゴヌクレオチドRNAiR（GATTGAGATATTACCTGCAGGTACTCACCCGGGTG）を0.06 μ mol/lの最終濃度で用いた。また、反応条件は、反応液50 μ l中に、約2ngの標的配列（Z8755の部分配列）を挿入したプラスミド（pRNAi-Z8755）、1 μ lの耐熱性DNAポリメラーゼ（KOD-Plus-）、5 μ lの10 \times バッファー、2 μ lの25mM MgSO₄、5 μ lの2mM dNTP（以上TOYOBO社）、3 μ lの10 μ M RNAiF、3 μ lの1 μ M RNAiRが含まれ、94℃で2分の熱変性のあと、94℃15秒と68℃3分30秒を50サイクルのPCRとした。

【0042】

(4) 標的配列の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子のサブクローニング

上記(3)のPCRによって増幅されたPCR産物を、周知の手段で、プラスミドベクターにサブクローニングして、標的配列が逆位反復構造をとっていることを塩基配列の決定により確認した。ここでは、プラスミドベクターとしてpENTR/D TOPO vector（Invitrogen社）を用い、塩基配列の決定はサイクルシーケンス法を用いた。

【産業上の利用可能性】

【0043】

本発明は、RNAi技術により形質転換体、ノックアウト動物、植物を作出する技術分野において用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】 本発明によって作り出される標的配列の逆位反復構造の模式図

【図2】 カセットコンストラクトの調製手順その1

【図3】 カセットコンストラクトの調製手順その2

【図4】 カセットコンストラクトを組み込んだ標的配列の逆位反復構造作成用プラスミドベクターの調製手順

【図5】 標的配列の逆位反復構造を有するキメラ遺伝子の調製手順

【図6】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト1の説明図

【図7】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト2の説明図

【図8】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト3の説明図

【図9】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト4の説明図

【図10】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト5の説明図

【図11】 標的配列結合容易化カセットコンストラクト6の説明図

【図12】 カセットコンストラクトを組み込んだ標的配列の逆位反復構造作成用プラスミドベクターの修飾例

【図13】 pGEMA 及びpGEMASの調製法

【図14】 pRNAiの調製法


【図15】 標的配列Z8755のpRNAiへの挿入

【図16】 標的配列Z8755の逆位反復構造を有するキメラ遺伝子の調製

【配列表フリーテキスト】

【0045】

配列番号1は、アダプター配列及びその逆位配列の連結物である。配列番号2及び3は



、プライマーである。配列番号 4 は、シロイヌナズナFAD2遺伝子のイントロン配列を含む DNA配列である。配列番号 5 は、ヒヤクニチソウcDNA (Z8755) の部分DNA配列である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Method of preparing inverted repeat sequence

<130> RJH15-067P

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 53

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> adaptor sequence

<400> 1

gagatattac ctgcaggtac tcacccgggt gactacctgc aggtaatatc tca 53

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Primer A

<400> 2

cccctcgagg tcgacggtat cgataagctt gat 33

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Primer B

<400> 3

gattgagata ttacctgcag gtactcaccc ggggtg 35

<210> 4

<211> 1144

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> DNA sequence containing the first intron of the Arabidopsis thaliana FAD2 gene

<400> 4

atccagggtcc	gtcgtttctc	ttccatttct	tctcattttc	gatttttgatt	cttattttctt	60
tccagtagct	cctgctctgt	gaatttctcc	gctcacgata	gatctgctta	tactccttac	120
attcaacctt	agatctgggc	tcgattctct	gtttctctgt	ttttttcttt	tggtcgagaa	180
tctgatgttt	gtttatgttc	tgtcaccatt	aataataatg	aactctctca	ttcatacaat	240
gattagtttc	tctcgtctac	aaaacgatat	gttgcathtt	cacttttctt	ctttttttct	300
aagatgattt	gctttgacca	atttgtttag	atctttattc	tattttattt	tctgggtgggt	360
tggtggaaat	tgaaaaaaaa	aaaacagcat	aaattgttat	ttgttaatgt	attcattttt	420
tggtctattg	ttctgggtaa	aaatctgctt	ctactattga	atctttcctg	gattttttac	480
tcctattggg	tttttatagt	aaaaatacat	aataaaaagg	aaacaaaagt	tttatagatt	540
ctcttaaacc	ccttacgata	aaagttagga	tcaaaaataat	tcaggatcag	atgctctttg	600
attgattcag	atgcgattac	agttgcatgg	caaattttct	agatccgtcg	tcacatttta	660
ttttctgttt	aaatatctaa	atctgatata	tgatgtcgac	aaattctggg	ggcttataca	720
tcacttcaac	tgttttcttt	tggttttggt	tgtcaacttg	gttttcaata	cgatttgtga	780
tttcgatcgc	tgaattttta	atacaagcaa	actgatgtta	accacaagca	agagatgtga	840
cctgccttat	taacatcgta	ttacttacta	ctagtcgtat	tctcaacgca	atcgtttttg	900
tattttctac	attatgccgc	ttctctactc	tttatccctt	ttgggtccacg	cattttctat	960
ttgtggcaat	ccctttcaca	acctgatttc	ccactttgga	tcatttgtct	gaagactctc	1020
ttgaatcggt	accacttggt	tcttgtgcat	gctctgtttt	ttagaattaa	tgataaaact	1080
attccatagt	cttgagtttt	cagcttggtg	attcttttgc	ttttggtttt	ctgcagaaac	1140
accc						1144

<210> 5

<211>

<212> DNA

<213> artificial

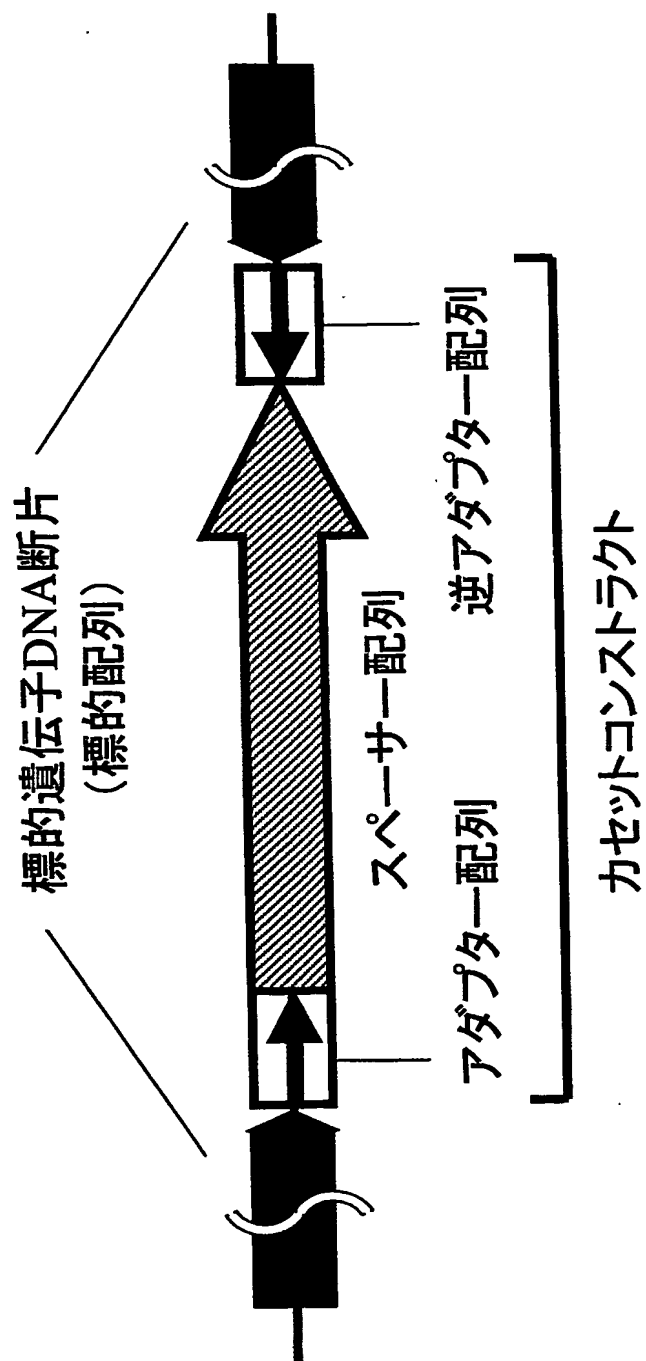
<220>

<223> Partial DNA sequence of the Zinnia elegans cDNA, Z8755

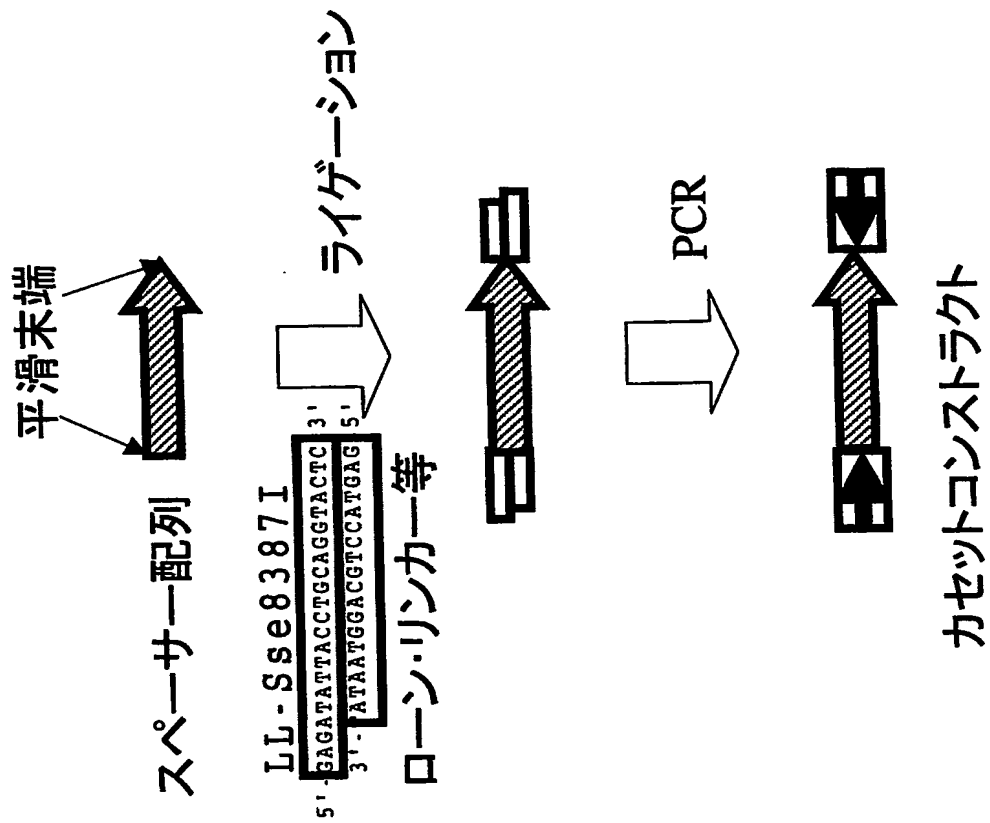
<400> 5

acacgtttcc	tggagctgta	acttgcacgc	tgtatgcata	ctctggagga	atgtaaccaa	60
aggagccccg	aacagcgcta	atactagcag				90

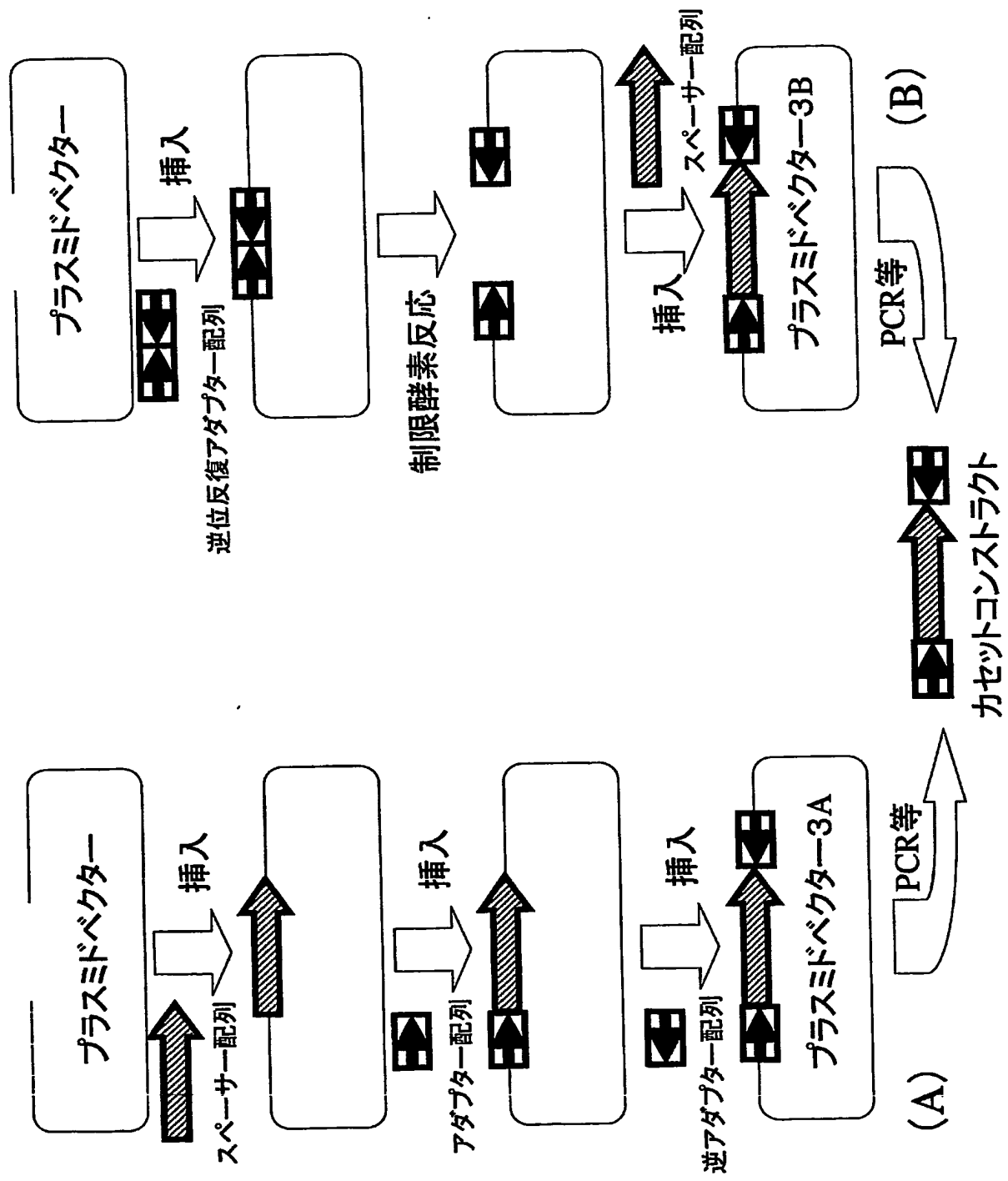
【書類名】 図面
【図 1】



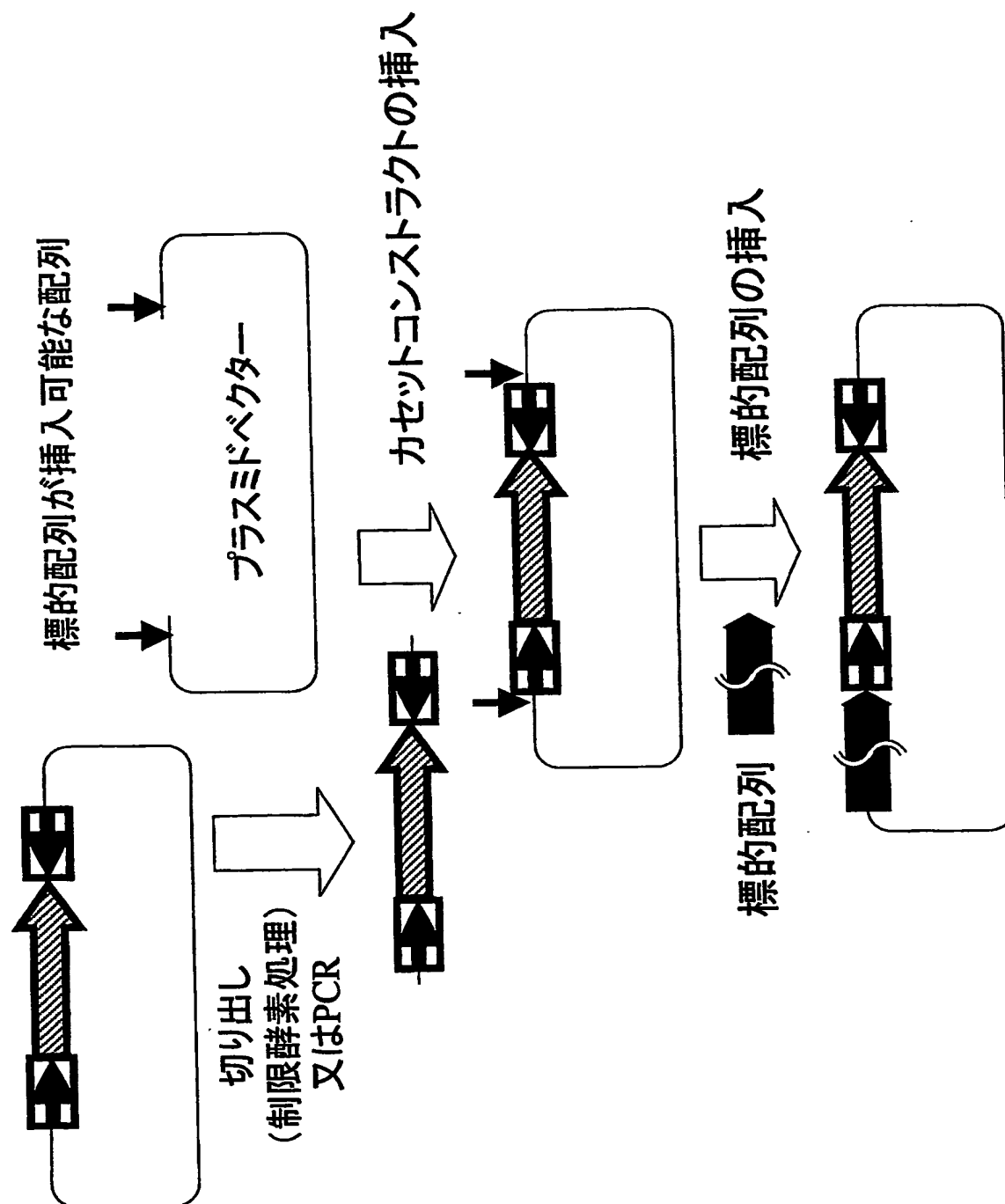
【図 2】



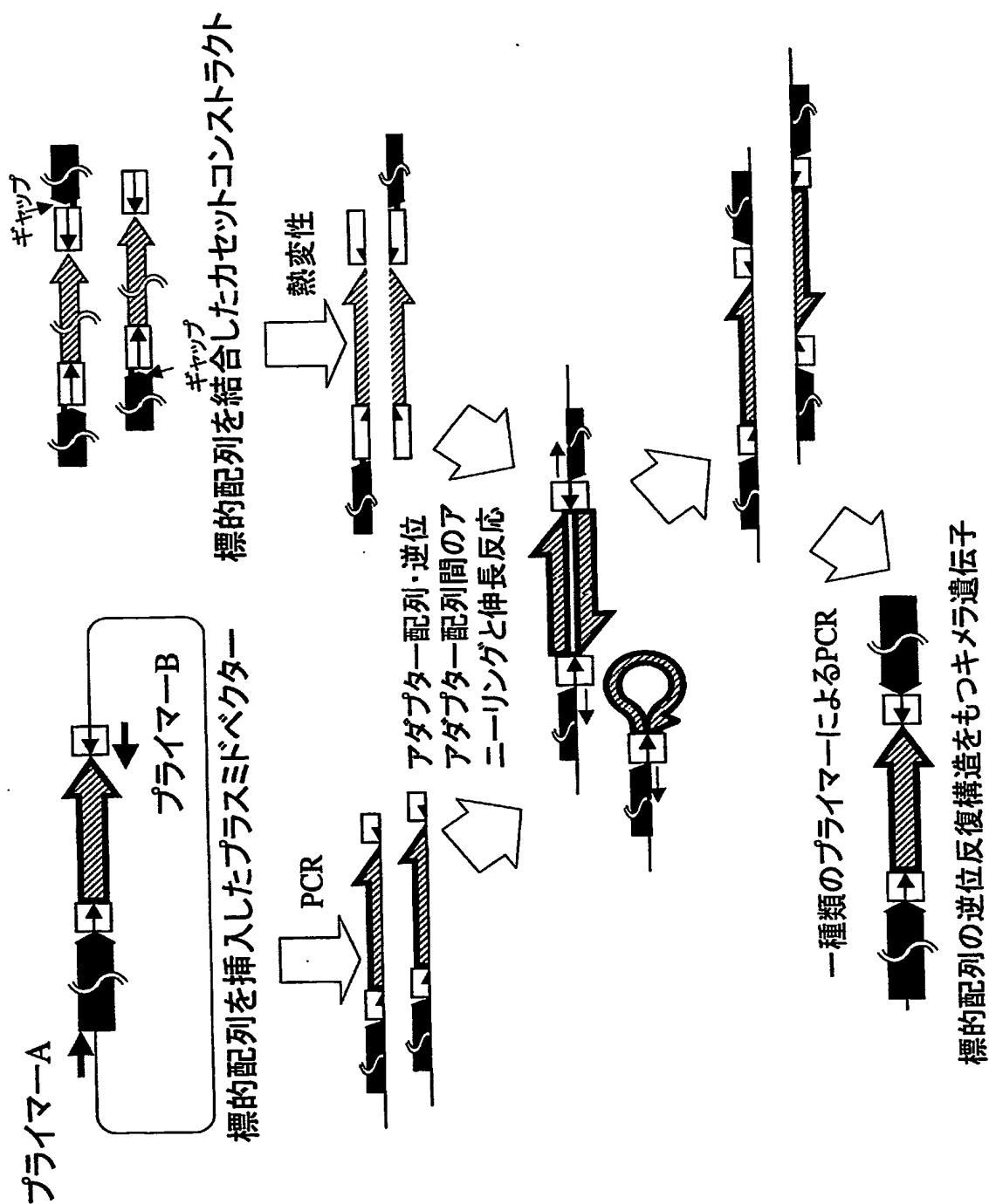
【図 3】



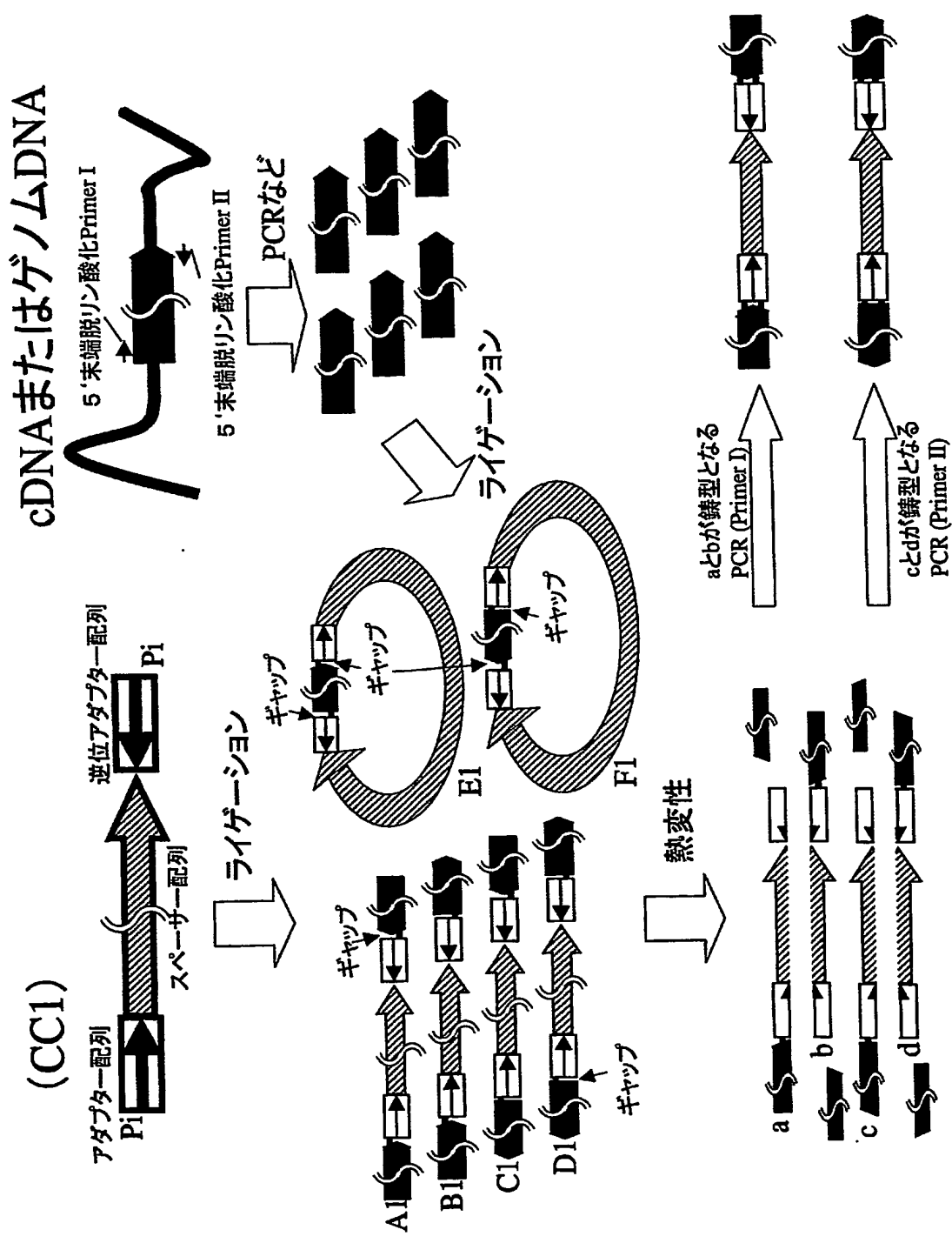
【図 4】



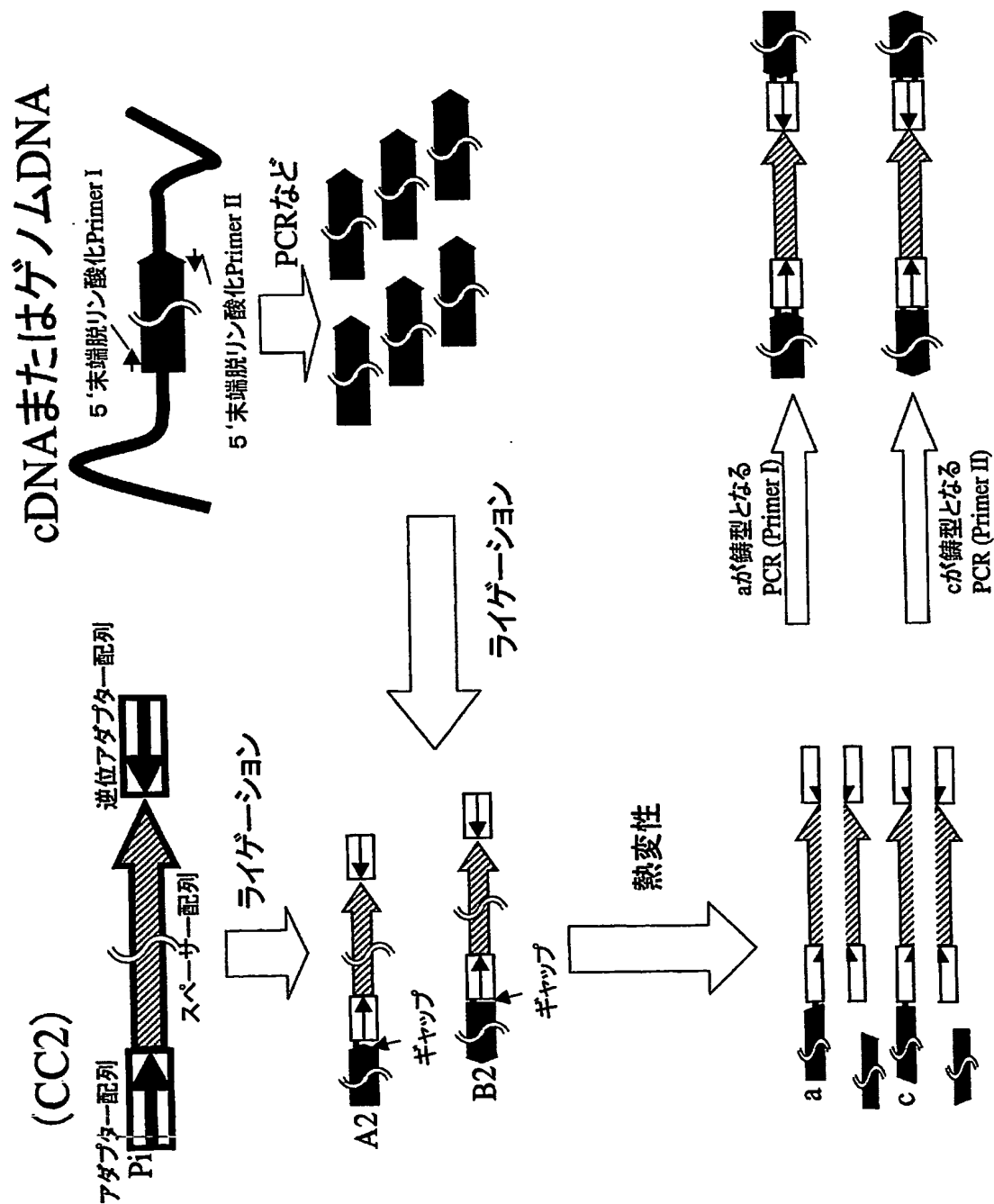
【図5】



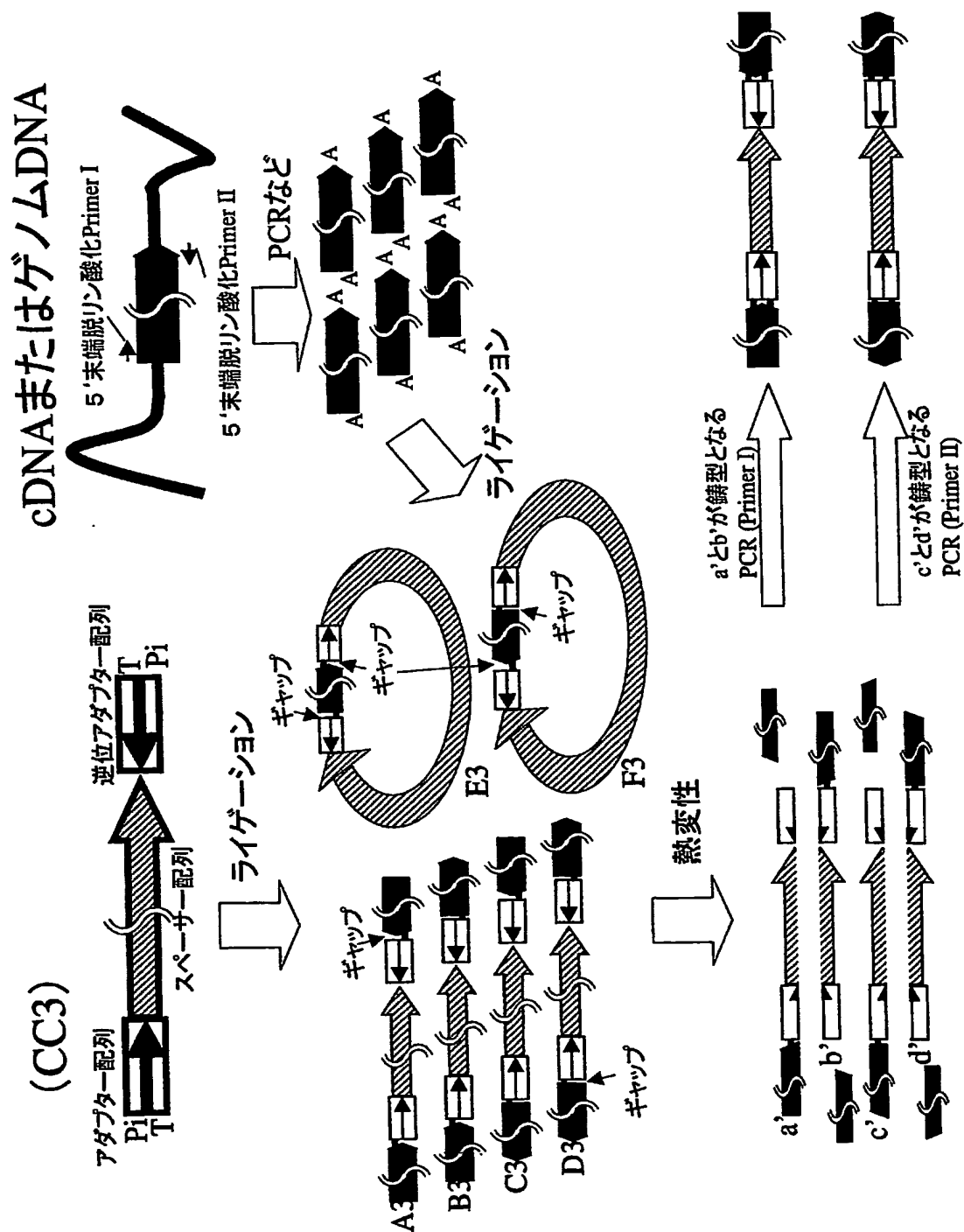
【図 6】



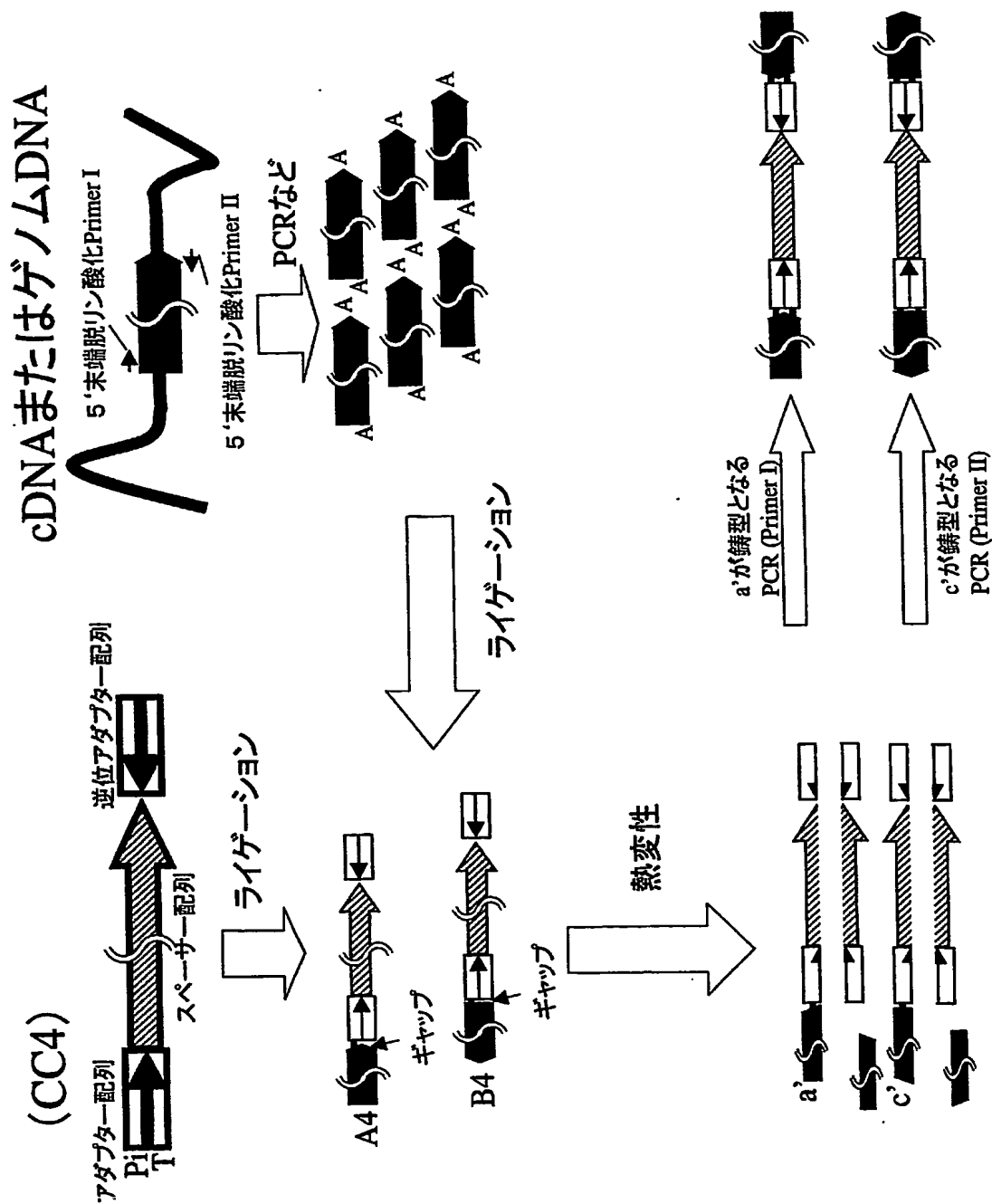
【図7】



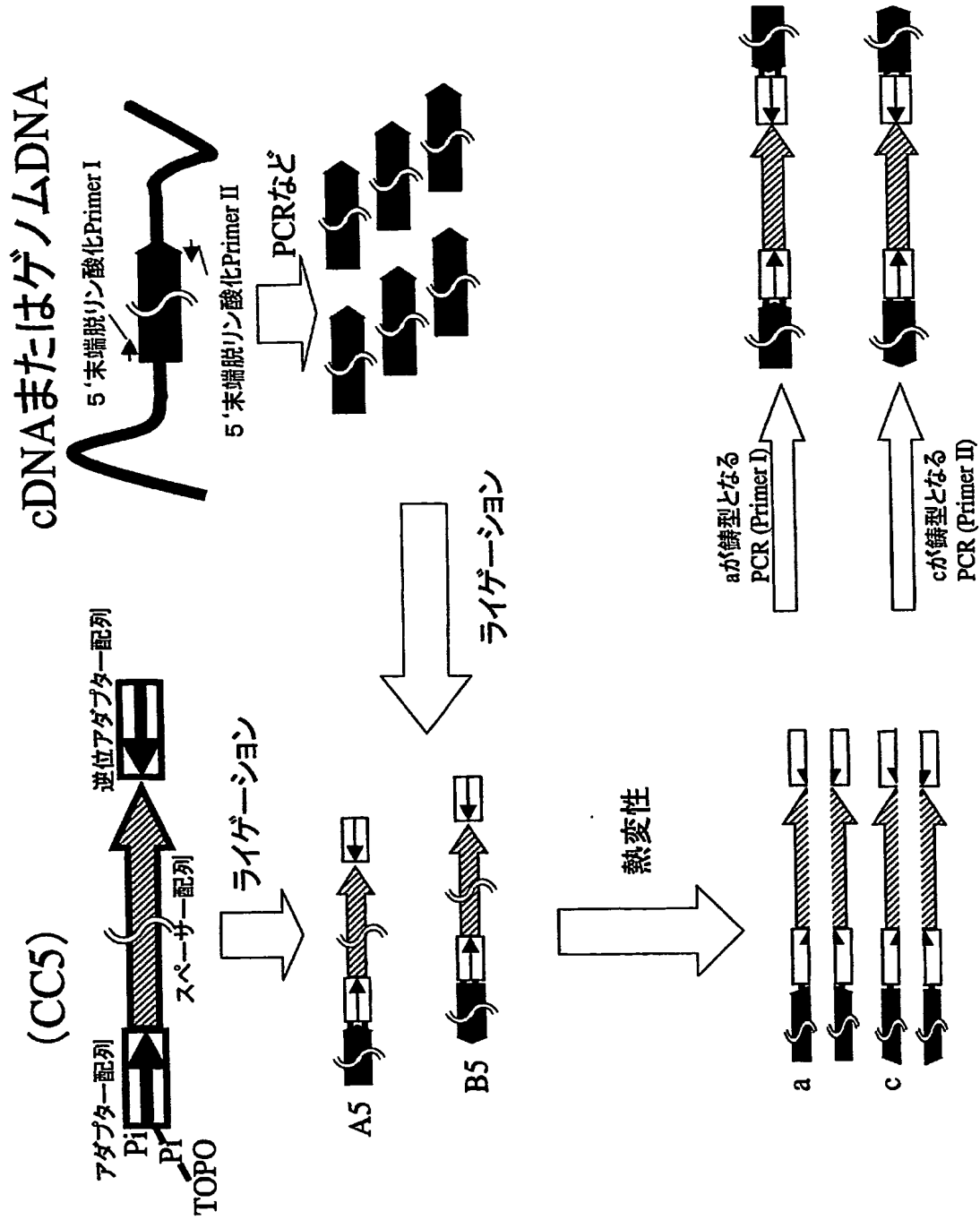
【図8】



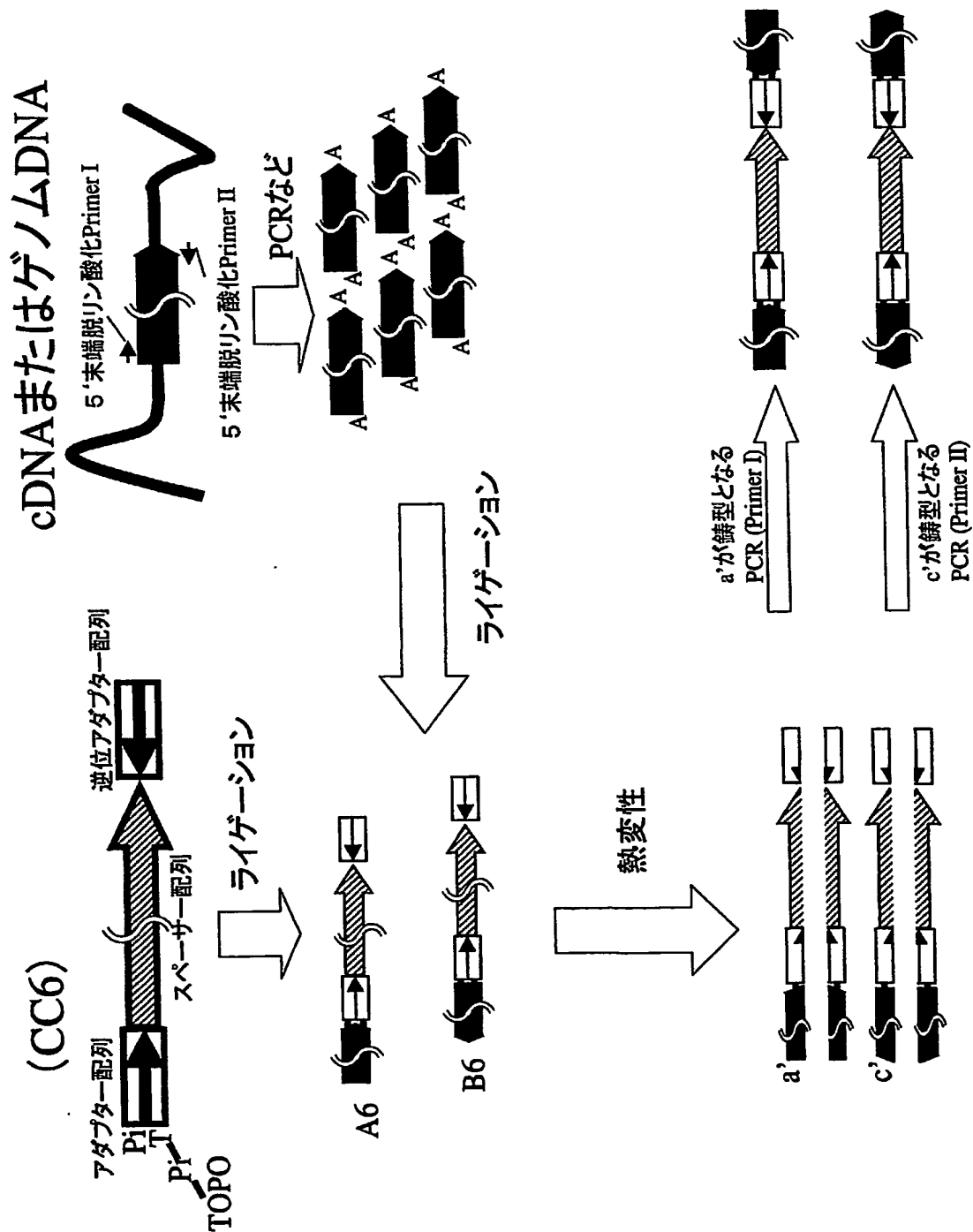
【図 9】



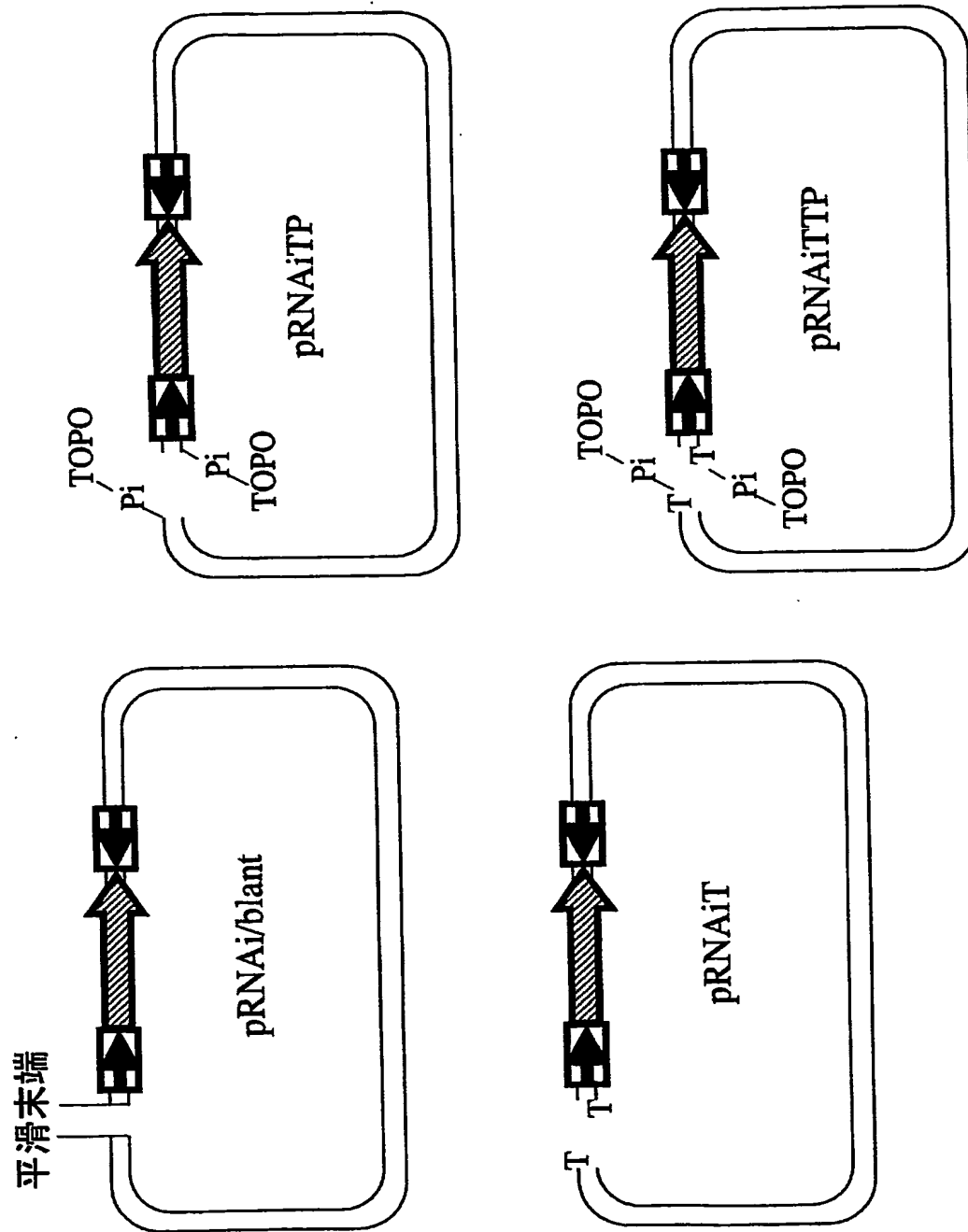
【図 10】



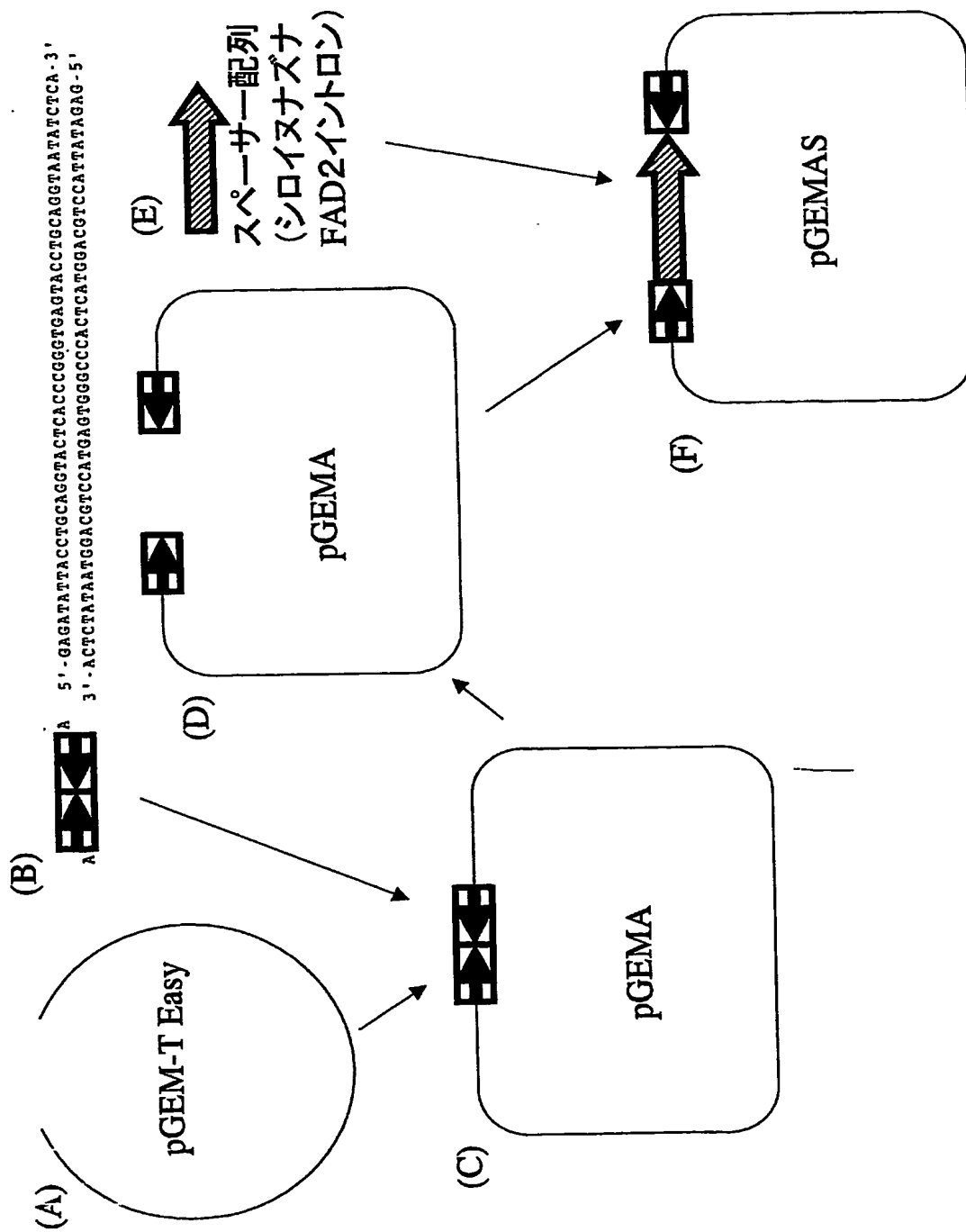
【図11】



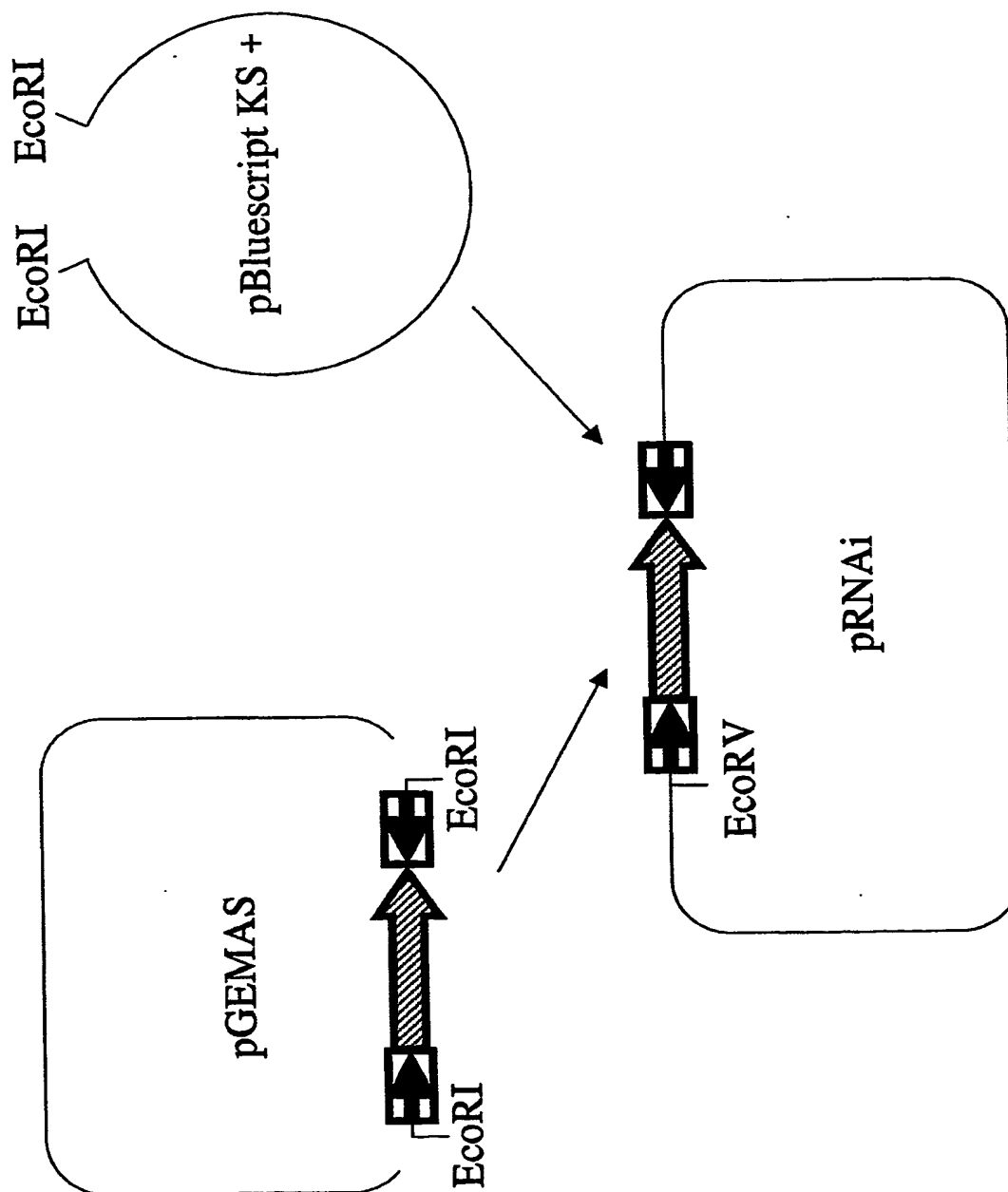
【図 12】



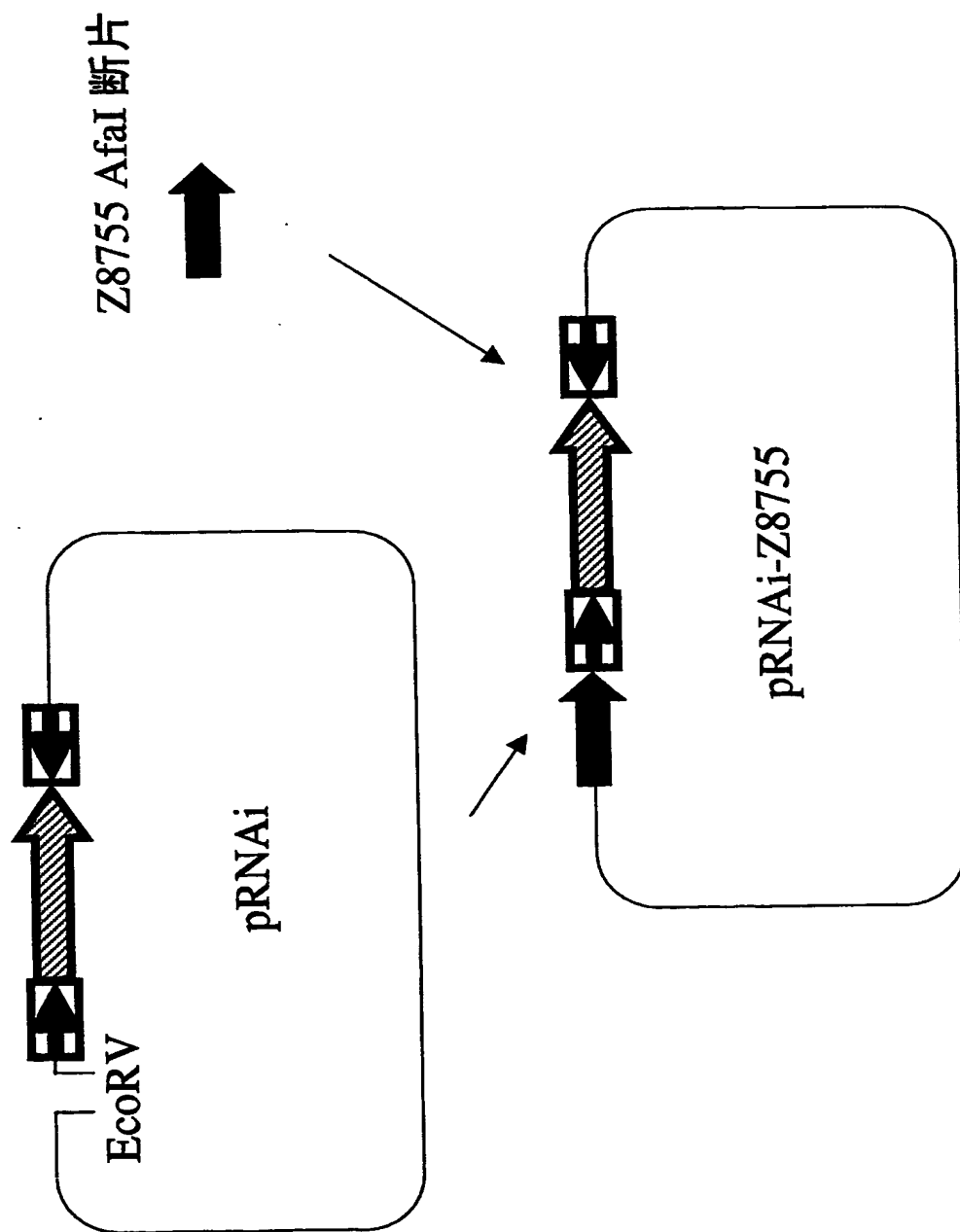
【図 13】



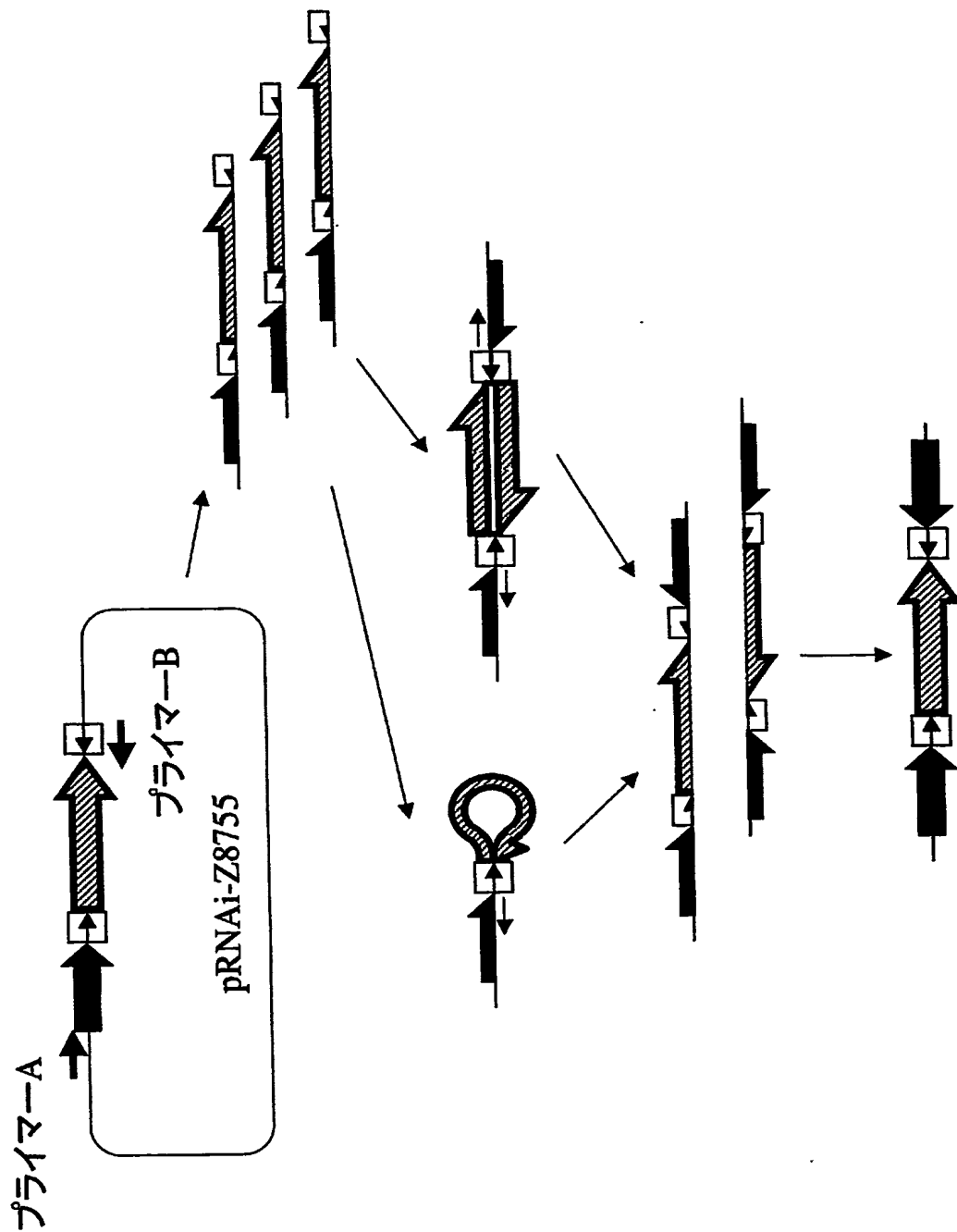
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 従来の標的遺伝子DNA断片（標的配列）の逆位反復構造をもつキメラ遺伝子の作製技術では、任意ベクター上のプロモーター配列下流の2箇所に標的配列をセンス方向とアンチセンス方向、あるいは、アンチセンス方向とセンス方向に、個別に挿入する必要がある。そのためには、ベクター上の2箇所のDNA断片挿入部位にそれぞれ独立した制限酵素認識配列が存在し、標的配列両末端にもDNA断片挿入部位に対応する制限酵素認識配列が存在しなければならず、また作製操作が煩雑であり、網羅的な遺伝子機能の解析には適していない。

【解決手段】 任意のスペーサー配列を挟んで任意の塩基配列（アダプター配列）及び当該アダプター配列の逆位に反復した塩基配列（逆位アダプター配列）が配置したDNA構築物であるカセットコンストラクト、または、カセットコンストラクトを組み込んだプラスミドベクターを作製する。上記カセットコンストラクトの一方または両方の末端に標的配列を結合させた後か、上記プラスミドベクター上のカセットコンストラクトの一方の末端に標的配列を挿入した後に、PCRを行うことで、逆位反復構造をもつキメラ遺伝子を調製する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年12月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-330569
【承継人】
【識別番号】 503359821
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】
【識別番号】 100075812
【弁理士】
【氏名又は名称】 吉武 賢次
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
【物件名】 委任状 1

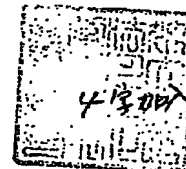
【物件名】

委任状

【添付書類】 125

(1)  5

委 任 状



私は、

識別番号 100075812 弁理士 吉 武 賢 次 氏
を代理人と定めて下記事項を委任する。

1. 別紙目録に記載の特許出願に関する出願人名義変更届をする件
954件
2. 上記各項の手続を処理するため復代理人を選任及び解任する件

以 上

平成 15 年 11 月 13 日

住所又は居所 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏名又は名称 独立行政法人 理化学研究所
代 表 者 理事長 野 依 良 浩



BEST AVAILABLE COPY

目 録 (1)

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. 特願昭63-235737 | 51. 特願平07-327372 |
| 2. 特願平05-044143 | 52. 特願平08-000652 |
| 3. 特願平05-127257 | 53. 特願平08-026368 |
| 4. 特願平05-127258 | 54. 特願平08-030850 |
| 5. 特願平05-213675 | 55. 特願平08-041279 |
| 6. 特願平05-306164 | 56. 特願平08-045903 |
| 7. 特願平05-328611 | 57. 特願平08-051604 |
| 8. 特願平05-336746 | 58. 特願平08-065715 |
| 9. 特願平06-035100 | 59. 特願平08-070071 |
| 10. 特願平06-061792 | 60. 特願平08-105667 |
| 11. 特願平06-061793 | 61. 特願平08-107784 |
| 12. 特願平06-069150 | 62. 特願平08-116473 |
| 13. 特願平06-097098 | 63. 特願平08-123475 |
| 14. 特願平06-111624 | 64. 特願平08-127005 |
| 15. 特願平06-121100 | 65. 特願平08-131746 |
| 16. 特願平06-145908 | 66. 特願平08-132846 |
| 17. 特願平06-158670 | 67. 特願平08-132854 |
| 18. 特願平06-158671 | 68. 特願平08-142676 |
| 19. 特願平06-165751 | 69. 特願平08-158078 |
| 20. 特願平06-165752 | 70. 特願平08-167401 |
| 21. 特願平06-181857 | 71. 特願平08-196331 |
| 22. 特願平06-235742 | 72. 特願平08-197050 |
| 23. 特願平06-238603 | 73. 特願平08-197051 |
| 24. 特願平06-244764 | 74. 特願平08-211946 |
| 25. 特願平06-248486 | 75. 特願平08-216506 |
| 26. 特願平06-252942 | 76. 特願平08-216508 |
| 27. 特願平06-268723 | 77. 特願平08-222352 |
| 28. 特願平06-293933 | 78. 特願平08-231066 |
| 29. 特願平06-301372 | 79. 特願平08-233442 |
| 30. 特願平06-323795 | 80. 特願平08-236685 |
| 31. 特願平06-324490 | 81. 特願平08-251410 |
| 32. 特願平06-507966 (不願2002-12420) | 82. 特願平08-262051 |
| 33. 特願平07-007185 | 83. 特願平08-302896 |
| 34. 特願平07-069255 | 84. 特願平08-308335 |
| 35. 特願平07-082880 | 85. 特願平08-308336 |
| 36. 特願平07-083142 | 86. 特願平08-311467 |
| 37. 特願平07-117933 | 87. 特願平08-315093 |
| 38. 特願平07-133487 | 88. 特願平08-317622 |
| 39. 特願平07-205141 | 89. 特願平08-320241 |
| 40. 特願平07-214659 | 90. 特願平08-606395 |
| 41. 特願平07-217276 | 91. 特願平09-002295 |
| 42. 特願平07-236185 | 92. 特願平09-010602 |
| 43. 特願平07-240684 | 93. 特願平09-019968 |
| 44. 特願平07-249244 | 94. 特願平09-019969 |
| 45. 特願平07-259822 | 95. 特願平09-019971 |
| 46. 特願平07-282716 | 96. 特願平09-024890 |
| 47. 特願平07-302793 | 97. 特願平09-028982 |
| 48. 特願平07-306004 | 98. 特願平09-046824 |
| 49. 特願平07-311711 | 99. 特願平09-049254 |
| 50. 特願平07-311715 | 100. 特願平09-053478 |

目録(2)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 101. 特願平09-054595 | 151. 特願平10-045434 |
| 102. 特願平09-056654 | 152. 特願平10-049499 |
| 103. 特願平09-057342 | 153. 特願平10-049867 |
| 104. 特願平09-058774 | 154. 特願平10-051489 |
| 105. 特願平09-067611 | 155. 特願平10-051490 |
| 106. 特願平09-074394 | 156. 特願平10-051491 |
| 107. 特願平09-080480 | 157. 特願平10-051492 |
| 108. 特願平09-082965 | 158. 特願平10-051493 |
| 109. 特願平09-091523 | 159. 特願平10-060740 |
| 110. 特願平09-091591 | 160. 特願平10-060741 |
| 111. 特願平09-091694 | 161. 特願平10-061895 |
| 112. 特願平09-096988 | 162. 特願平10-078139 |
| 113. 特願平09-099061 | 163. 特願平10-085207 |
| 114. 特願平09-099109 | 164. 特願平10-085208 |
| 115. 特願平09-104093 | 165. 特願平10-103083 |
| 116. 特願平09-119730 | 166. 特願平10-103115 |
| 117. 特願平09-129068 | 167. 特願平10-103671 |
| 118. 特願平09-134525 | 168. 特願平10-104093 |
| 119. 特願平09-147964 | 169. 特願平10-113493 |
| 120. 特願平09-155364 | 170. 特願平10-116378 |
| 121. 特願平09-159963 | 171. 特願平10-121456 |
| 122. 特願平09-163630 | 172. 特願平10-127520 |
| 123. 特願平09-163631 | 173. 特願平10-136198 |
| 124. 特願平09-171924 | 174. 特願平10-149603 |
| 125. 特願平09-175896 | 175. 特願平10-150494 |
| 126. 特願平09-180423 | 176. 特願平10-151245 |
| 127. 特願平09-189436 | 177. 特願平10-155838 |
| 128. 特願平09-198201 | 178. 特願平10-155841 |
| 129. 特願平09-208866 | 179. 特願平10-156104 |
| 130. 特願平09-221067 | 180. 特願平10-156108 |
| 131. 特願平09-228345 | 181. 特願平10-198313 |
| 132. 特願平09-230870 | 182. 特願平10-200280 |
| 133. 特願平09-253740 | 183. 特願平10-217132 |
| 134. 特願平09-256795 | 184. 特願平10-217180 |
| 135. 特願平09-271782 | 185. 特願平10-222837 |
| 136. 特願平09-291995 | 186. 特願平10-227939 |
| 137. 特願平09-297084 | 187. 特願平10-229591 |
| 138. 特願平09-307627 | 188. 特願平10-232520 |
| 139. 特願平09-308597 | 189. 特願平10-232590 |
| 140. 特願平09-309848 | 190. 特願平10-236009 |
| 141. 特願平09-327140 | 191. 特願平10-237485 |
| 142. 特願平09-327609 | 192. 特願平10-238144 |
| 143. 特願平09-328742 | 193. 特願平10-245293 |
| 144. 特願平09-360327 | 194. 特願平10-250598 |
| 145. 特願平10-002030 | 195. 特願平10-250611 |
| 146. 特願平10-010471 | 196. 特願平10-252128 |
| 147. 特願平10-014152 | 197. 特願平10-260347 |
| 148. 特願平10-015690 | 198. 特願平10-260416 |
| 149. 特願平10-024892 | 199. 特願平10-268791 |
| 150. 特願平10-043335 | 200. 特願平10-269859 |

目録(3)

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 201. 特願平10-272529 | 251. 特願平11-135137 |
| 202. 特願平10-280351 | 252. 特願平11-135482 |
| 203. 特願平10-308533 | 253. 特願平11-143429 |
| 204. 特願平10-309765 | 254. 特願平11-144005 |
| 205. 特願平10-311673 | 255. 特願平11-147097 |
| 206. 特願平10-311674 | 256. 特願平11-151099 |
| 207. 特願平10-311675 | 257. 特願平11-166247 |
| 208. 特願平10-314856 | 258. 特願平11-173839 |
| 209. 特願平10-315751 | 259. 特願平11-179278 |
| 210. 特願平10-338896 | 260. 特願平11-186052 |
| 211. 特願平10-338897 | 261. 特願平11-193235 |
| 212. 特願平10-338898 | 262. 特願平11-224269 |
| 213. 特願平10-338899 | 263. 特願平11-225060 |
| 214. 特願平10-352428 | 264. 特願平11-225832 |
| 215. 特願平10-354665 | 265. 特願平11-225839 |
| 216. 特願平10-363297 | 266. 特願平11-226176 |
| 217. 特願平10-363329 | 267. 特願平11-234800 |
| 218. 特願平10-506788 | 268. 特願平11-240325 |
| 219. 特願平10-532832 | 269. 特願平11-240910 |
| 220. 特願平10-535583 | 270. 特願平11-241737 |
| 221. 特願平11-008183 | 271. 特願平11-242438 |
| 222. 特願平11-013380 | 272. 特願平11-242490 |
| 223. 特願平11-015176 | 273. 特願平11-253851 |
| 224. 特願平11-031724 | 274. 特願平11-260947 |
| 225. 特願平11-035776 | 275. 特願平11-277759 |
| 226. 特願平11-046372 | 276. 特願平11-278976 |
| 227. 特願平11-055835 | 277. 特願平11-279324 |
| 228. 特願平11-055867 | 278. 特願平11-281632 |
| 229. 特願平11-055930 | 279. 特願平11-303976 |
| 230. 特願平11-056957 | 280. 特願平11-309616 |
| 231. 特願平11-057381 | 281. 特願平11-315036 |
| 232. 特願平11-057749 | 282. 特願平11-321282 |
| 233. 特願平11-058103 | 283. 特願平11-336079 |
| 234. 特願平11-061079 | 284. 特願平11-346467 |
| 235. 特願平11-061080 | 285. 特願平11-354563 |
| 236. 特願平11-064193 | 286. 特願平11-360274 |
| 237. 特願平11-064372 | 287. 特願平11-365899 |
| 238. 特願平11-064506 | 288. 特願平11-373483 |
| 239. 特願平11-065136 | 289. 特願平11-510791 |
| 240. 特願平11-074385 | 290. 特願平11-515324 |
| 241. 特願平11-081225 | 291. 特願2000-001783 |
| 242. 特願平11-090389 | 292. 特願2000-005221 |
| 243. 特願平11-091875 | 293. 特願2000-009363 |
| 244. 特願平11-103231 | 294. 特願2000-010516 |
| 245. 特願平11-104509 | 295. 特願2000-011147 |
| 246. 特願平11-106920 | 296. 特願2000-011623 |
| 247. 特願平11-124187 | 297. 特願2000-016518 |
| 248. 特願平11-130771 | 298. 特願2000-016622 |
| 249. 特願平11-130814 | 299. 特願2000-017112 |
| 250. 特願平11-130815 | 300. 特願2000-018612 |

目 録 (4)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 301. 特願 2000-019195 | 351. 特願 2000-141763 |
| 302. 特願 2000-019528 | 352. 特願 2000-148843 |
| 303. 特願 2000-020067 | 353. 特願 2000-152455 |
| 304. 特願 2000-030321 | 354. 特願 2000-152469 |
| 305. 特願 2000-034109 | 355. 特願 2000-154484 |
| 306. 特願 2000-039082 | 356. 特願 2000-161895 |
| 307. 特願 2000-040355 | 357. 特願 2000-163122 |
| 308. 特願 2000-041927 | 358. 特願 2000-164584 |
| 309. 特願 2000-041929 | 359. 特願 2000-179723 |
| 310. 特願 2000-045318 | 360. 特願 2000-181281 |
| 311. 特願 2000-045855 | 361. 特願 2000-184259 |
| 312. 特願 2000-051488 | 362. 特願 2000-184295 |
| 313. 特願 2000-051650 | 363. 特願 2000-191007 |
| 314. 特願 2000-052040 | 364. 特願 2000-191265 |
| 315. 特願 2000-053707 | 365. 特願 2000-192332 |
| 316. 特願 2000-054949 | 366. 特願 2000-193817 |
| 317. 特願 2000-056093 | 367. 特願 2000-195384 |
| 318. 特願 2000-056879 | 368. 特願 2000-196991 |
| 319. 特願 2000-057564 | 369. 特願 2000-197022 |
| 320. 特願 2000-057565 | 370. 特願 2000-202801 |
| 321. 特願 2000-057566 | 371. 特願 2000-216457 |
| 322. 特願 2000-058133 | 372. 特願 2000-223714 |
| 323. 特願 2000-058282 | 373. 特願 2000-224970 |
| 324. 特願 2000-062316 | 374. 特願 2000-225486 |
| 325. 特願 2000-064142 | 375. 特願 2000-225864 |
| 326. 特願 2000-064209 | 376. 特願 2000-225978 |
| 327. 特願 2000-071119 | 377. 特願 2000-226361 |
| 328. 特願 2000-076122 | 378. 特願 2000-229191 |
| 329. 特願 2000-085874 | 379. 特願 2000-230551 |
| 330. 特願 2000-089078 | 380. 特願 2000-237165 |
| 331. 特願 2000-092693 | 381. 特願 2000-237166 |
| 332. 特願 2000-100395 | 382. 特願 2000-237533 |
| 333. 特願 2000-105139 | 383. 特願 2000-246309 |
| 334. 特願 2000-105917 | 384. 特願 2000-248331 |
| 335. 特願 2000-107160 | 385. 特願 2000-249232 |
| 336. 特願 2000-108409 | 386. 特願 2000-256149 |
| 337. 特願 2000-109638 | 387. 特願 2000-257080 |
| 338. 特願 2000-109954 | 388. 特願 2000-257083 |
| 339. 特願 2000-118361 | 389. 特願 2000-260030 |
| 340. 特願 2000-120874 | 390. 特願 2000-261233 |
| 341. 特願 2000-123634 | 391. 特願 2000-264743 |
| 342. 特願 2000-128431 | 392. 特願 2000-265344 |
| 343. 特願 2000-131049 | 393. 特願 2000-278502 |
| 344. 特願 2000-131050 | 394. 特願 2000-279557 |
| 345. 特願 2000-131745 | 395. 特願 2000-292422 |
| 346. 特願 2000-134427 | 396. 特願 2000-292832 |
| 347. 特願 2000-136551 | 397. 特願 2000-299812 |
| 348. 特願 2000-136572 | 398. 特願 2000-307464 |
| 349. 特願 2000-138977 | 399. 特願 2000-308248 |
| 350. 特願 2000-141566 | 400. 特願 2000-309581 |

目録(5)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 401. 特願 2000-319775 | 451. 特願 2001-071435 |
| 402. 特願 2000-322056 | 452. 特願 2001-072650 |
| 403. 特願 2000-333311 | 453. 特願 2001-072668 |
| 404. 特願 2000-334686 | 454. 特願 2001-072963 |
| 405. 特願 2000-334969 | 455. 特願 2001-073028 |
| 406. 特願 2000-343912 | 456. 特願 2001-074964 |
| 407. 特願 2000-347398 | 457. 特願 2001-074965 |
| 408. 特願 2000-347865 | 458. 特願 2001-077257 |
| 409. 特願 2000-358121 | 459. 特願 2001-078671 |
| 410. 特願 2000-368566 | 460. 特願 2001-084173 |
| 411. 特願 2000-374626 | 461. 特願 2001-089541 |
| 412. 特願 2000-375090 | 462. 特願 2001-091911 |
| 413. 特願 2000-378421 | 463. 特願 2001-092337 |
| 414. 特願 2000-378942 | 464. 特願 2001-116171 |
| 415. 特願 2000-378950 | 465. 特願 2001-124294 |
| 416. 特願 2000-384771 | 466. 特願 2001-124452 |
| 417. 特願 2000-387016 | 467. 特願 2001-127575 |
| 418. 特願 2000-394815 | 468. 特願 2001-127576 |
| 419. 特願 2000-396445 | 469. 特願 2001-135357 |
| 420. 特願 2000-399940 | 470. 特願 2001-137087 |
| 421. 特願 2000-400336 | 471. 特願 2001-138103 |
| 422. 特願 2000-401110 | 472. 特願 2001-142583 |
| 423. 特願 2000-401245 | 473. 特願 2001-147081 |
| 424. 特願 2000-401258 | 474. 特願 2001-152364 |
| 425. 特願 2000-503838 | 475. 特願 2001-152379 |
| 426. 特願 2000-571733 | 476. 特願 2001-153447 |
| 427. 特願 2000-571943 | 477. 特願 2001-155572 |
| 428. 特願 2000-602588 | 478. 特願 2001-163740 |
| 429. 特願 2000-602900 | 479. 特願 2001-164819 |
| 430. 特願 2000-618709 | 480. 特願 2001-164997 |
| 431. 特願 2001-003476 | 481. 特願 2001-165133 |
| 432. 特願 2001-005615 | 482. 特願 2001-167910 |
| 433. 特願 2001-007979 | 483. 特願 2001-168784 |
| 434. 特願 2001-016626 | 484. 特願 2001-171705 |
| 435. 特願 2001-025030 | 485. 特願 2001-173331 |
| 436. 特願 2001-037141 | 486. 特願 2001-174421 |
| 437. 特願 2001-037147 | 487. 特願 2001-174553 |
| 438. 特願 2001-042501 | 488. 特願 2001-175898 |
| 439. 特願 2001-044933 | 489. 特願 2001-178169 |
| 440. 特願 2001-047762 | 490. 特願 2001-179858 |
| 441. 特願 2001-050645 | 491. 特願 2001-180552 |
| 442. 特願 2001-053550 | 492. 特願 2001-180554 |
| 443. 特願 2001-054717 | 493. 特願 2001-187735 |
| 444. 特願 2001-059115 | 494. 特願 2001-197185 |
| 445. 特願 2001-059892 | 495. 特願 2001-197897 |
| 446. 特願 2001-060848 | 496. 特願 2001-200854 |
| 447. 特願 2001-062703 | 497. 特願 2001-201356 |
| 448. 特願 2001-065799 | 498. 特願 2001-202971 |
| 449. 特願 2001-065917 | 499. 特願 2001-203089 |
| 450. 特願 2001-068285 | 500. 特願 2001-206505 |

目録(6)

501.	特願2001-206522	551.	特願2001-325367
502.	特願2001-206523	552.	特願2001-326872
503.	特願2001-209305	553.	特願2001-327853
504.	特願2001-212947	554.	特願2001-329023
505.	特願2001-216505	555.	特願2001-332168
506.	特願2001-220219	556.	特願2001-337467
507.	特願2001-226176	557.	特願2001-339396
508.	特願2001-228287	558.	特願2001-339593
509.	特願2001-228374	559.	特願2001-346035
510.	特願2001-235412	560.	特願2001-347316
511.	特願2001-235747	561.	特願2001-347637
512.	特願2001-238951	562.	特願2001-349614
513.	特願2001-241023	563.	特願2001-351730
514.	特願2001-243930	564.	特願2001-352189
515.	特願2001-246642	565.	特願2001-353038
516.	特願2001-249976	566.	特願2001-358446
517.	特願2001-254377	567.	特願2001-358581
518.	特願2001-254378	568.	特願2001-359710
519.	特願2001-255589	569.	特願2001-374928
520.	特願2001-256576	570.	特願2001-376591
521.	特願2001-257188	571.	特願2001-378757
522.	特願2001-261158	572.	特願2001-380473
523.	特願2001-266004	573.	特願2001-382537
524.	特願2001-266069	574.	特願2001-382539
525.	特願2001-266454	575.	特願2001-382599
526.	特願2001-267194	576.	特願2001-385258
527.	特願2001-267379	577.	特願2001-385512
528.	特願2001-267863	578.	特願2001-385513
529.	特願2001-272977	579.	特願2001-385538
530.	特願2001-273964	580.	特願2001-388116
531.	特願2001-276053	581.	特願2001-390122
532.	特願2001-279406	582.	特願2001-392087
533.	特願2001-280319	583.	特願2001-392088
534.	特願2001-285145	584.	特願2001-395196
535.	特願2001-291059	585.	特願2001-396120
536.	特願2001-292223	586.	特願2001-397762
537.	特願2001-292224	587.	特願2001-397998
538.	特願2001-293000	588.	特願2001-401139
539.	特願2001-293054	589.	特願2001-515803
540.	特願2001-293936	590.	特願2001-523852
541.	特願2001-294013	591.	特願2001-557672
542.	特願2001-298140	592.	特願2002-000993
543.	特願2001-298402	593.	特願2002-005746
544.	特願2001-307340	594.	特願2002-010344
545.	特願2001-309501	595.	特願2002-011558
546.	特願2001-309508	596.	特願2002-019752
547.	特願2001-309984	597.	特願2002-020329
548.	特願2001-310554	598.	特願2002-022499
549.	特願2001-313430	599.	特願2002-028046
550.	特願2001-319360	600.	特願2002-028109

目録(7)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 601. 特願 2002-040151 | 651. 特願 2002-162157 |
| 602. 特願 2002-042829 | 652. 特願 2002-162211 |
| 603. 特願 2002-044340 | 653. 特願 2002-182365 |
| 604. 特願 2002-044640 | 654. 特願 2002-167759 |
| 605. 特願 2002-046188 | 655. 特願 2002-170068 |
| 606. 特願 2002-047799 | 656. 特願 2002-170902 |
| 607. 特願 2002-053190 | 657. 特願 2002-176435 |
| 608. 特願 2002-053575 | 658. 特願 2002-176583 |
| 609. 特願 2002-055272 | 659. 特願 2002-183722 |
| 610. 特願 2002-057253 | 660. 特願 2002-185966 |
| 611. 特願 2002-057565 | 661. 特願 2002-187362 |
| 612. 特願 2002-057935 | 662. 特願 2002-187957 |
| 613. 特願 2002-057963 | 663. 特願 2002-188281 |
| 614. 特願 2002-066249 | 664. 特願 2002-189265 |
| 615. 特願 2002-070624 | 665. 特願 2002-194627 |
| 616. 特願 2002-070987 | 666. 特願 2002-197812 |
| 617. 特願 2002-071924 | 667. 特願 2002-201443 |
| 618. 特願 2002-074902 | 668. 特願 2002-201575 |
| 619. 特願 2002-078164 | 669. 特願 2002-202118 |
| 620. 特願 2002-081467 | 670. 特願 2002-205814 |
| 621. 特願 2002-081502 | 671. 特願 2002-205825 |
| 622. 特願 2002-083081 | 672. 特願 2002-217714 |
| 623. 特願 2002-084139 | 673. 特願 2002-221188 |
| 624. 特願 2002-085017 | 674. 特願 2002-225469 |
| 625. 特願 2002-087342 | 675. 特願 2002-225724 |
| 626. 特願 2002-094681 | 676. 特願 2002-226859 |
| 627. 特願 2002-095132 | 677. 特願 2002-227286 |
| 628. 特願 2002-095389 | 678. 特願 2002-229686 |
| 629. 特願 2002-100431 | 679. 特願 2002-230562 |
| 630. 特願 2002-106561 | 680. 特願 2002-235294 |
| 631. 特願 2002-119320 | 681. 特願 2002-235737 |
| 632. 特願 2002-120371 | 682. 特願 2002-236838 |
| 633. 特願 2002-123347 | 683. 特願 2002-237058 |
| 634. 特願 2002-128854 | 684. 特願 2002-237092 |
| 635. 特願 2002-133717 | 685. 特願 2002-248946 |
| 636. 特願 2002-133749 | 686. 特願 2002-253322 |
| 637. 特願 2002-134313 | 687. 特願 2002-253689 |
| 638. 特願 2002-141187 | 688. 特願 2002-253697 |
| 639. 特願 2002-141438 | 689. 特願 2002-254096 |
| 640. 特願 2002-142260 | 690. 特願 2002-257924 |
| 641. 特願 2002-149471 | 691. 特願 2002-260788 |
| 642. 特願 2002-149931 | 692. 特願 2002-261499 |
| 643. 特願 2002-150541 | 693. 特願 2002-264969 |
| 644. 特願 2002-154688 | 694. 特願 2002-267114 |
| 645. 特願 2002-154695 | 695. 特願 2002-268987 |
| 646. 特願 2002-154823 | 696. 特願 2002-270917 |
| 647. 特願 2002-158237 | 697. 特願 2002-271375 |
| 648. 特願 2002-158352 | 698. 特願 2002-271473 |
| 649. 特願 2002-160277 | 699. 特願 2002-273996 |
| 650. 特願 2002-162148 | 700. 特願 2002-274469 |

目録(8)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 701. 特願2002-276051 | 751. 特願2003-012738 |
| 702. 特願2002-282746 | 752. 特願2003-012774 |
| 703. 特願2002-286487 | 753. 特願2003-015968 |
| 704. 特願2002-289209 | 754. 特願2003-016044 |
| 705. 特願2002-295332 | 755. 特願2003-016940 |
| 706. 特願2002-296911 | 756. 特願2003-017397 |
| 707. 特願2002-299429 | 757. 特願2003-021499 |
| 708. 特願2002-301875 | 758. 特願2003-024347 |
| 709. 特願2002-303838 | 759. 特願2003-024620 |
| 710. 特願2002-312131 | 760. 特願2003-025277 |
| 711. 特願2002-320102 | 761. 特願2003-027647 |
| 712. 特願2002-320704 | 762. 特願2003-027648 |
| 713. 特願2002-325909 | 763. 特願2003-031882 |
| 714. 特願2002-325920 | 764. 特願2003-032932 |
| 715. 特願2002-332232 | 765. 特願2003-038206 |
| 716. 特願2002-339344 | 766. 特願2003-040642 |
| 717. 特願2002-339392 | 767. 特願2003-043961 |
| 718. 特願2002-339541 | 768. 特願2003-050153 |
| 719. 特願2002-339551 | 769. 特願2003-050446 |
| 720. 特願2002-341195 | 770. 特願2003-052520 |
| 721. 特願2002-343807 | 771. 特願2003-052602 |
| 722. 特願2002-344279 | 772. 特願2003-052613 |
| 723. 特願2002-345597 | 773. 特願2003-052877 |
| 724. 特願2002-347401 | 774. 特願2003-053023 |
| 725. 特願2002-348760 | 775. 特願2003-054182 |
| 726. 特願2002-349042 | 776. 特願2003-054798 |
| 727. 特願2002-354594 | 777. 特願2003-054799 |
| 728. 特願2002-357768 | 778. 特願2003-054846 |
| 729. 特願2002-357900 | 779. 特願2003-054847 |
| 730. 特願2002-358019 | 780. 特願2003-054848 |
| 731. 特願2002-358967 | 781. 特願2003-054849 |
| 732. 特願2002-360972 | 782. 特願2003-055452 |
| 733. 特願2002-360975 | 783. 特願2003-056628 |
| 734. 特願2002-368112 | 784. 特願2003-061426 |
| 735. 特願2002-376555 | 785. 特願2003-063532 |
| 736. 特願2002-376774 | 786. 特願2003-065013 |
| 737. 特願2002-376831 | 787. 特願2003-071028 |
| 738. 特願2002-379214 | 788. 特願2003-072979 |
| 739. 特願2002-380624 | 789. 特願2003-074168 |
| 740. 特願2002-381888 | 790. 特願2003-076107 |
| 741. 特願2002-382170 | 791. 特願2003-078999 |
| 742. 特願2002-383870 | 792. 特願2003-079598 |
| 743. 特願2002-521644 | 793. 特願2003-079613 |
| 744. 特願2002-532458 | 794. 特願2003-082466 |
| 745. 特願2002-546564 | 795. 特願2003-083318 |
| 746. 特願2002-548185 | 796. 特願2003-083433 |
| 747. 特願2002-570743 | 797. 特願2003-083480 |
| 748. 特願2003-003450 | 798. 特願2003-085193 |
| 749. 特願2003-012550 | 799. 特願2003-089026 |
| 750. 特願2003-012694 | 800. 特願2003-090331 |

目録(9)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 801. 特願 2003-091446 | 851. 特願 2003-127135 |
| 802. 特願 2003-092654 | 852. 特願 2003-127150 |
| 803. 特願 2003-093642 | 853. 特願 2003-128818 |
| 804. 特願 2003-094272 | 854. 特願 2003-128897 |
| 805. 特願 2003-094719 | 855. 特願 2003-129347 |
| 806. 特願 2003-095770 | 856. 特願 2003-131313 |
| 807. 特願 2003-095884 | 857. 特願 2003-132280 |
| 808. 特願 2003-095885 | 858. 特願 2003-132605 |
| 809. 特願 2003-095886 | 859. 特願 2003-132806 |
| 810. 特願 2003-095904 | 860. 特願 2003-135591 |
| 811. 特願 2003-097283 | 861. 特願 2003-136445 |
| 812. 特願 2003-097327 | 862. 特願 2003-139397 |
| 813. 特願 2003-101917 | 863. 特願 2003-140684 |
| 814. 特願 2003-104928 | 864. 特願 2003-142303 |
| 815. 特願 2003-105362 | 865. 特願 2003-143932 |
| 816. 特願 2003-107267 | 866. 特願 2003-145221 |
| 817. 特願 2003-107268 | 867. 特願 2003-145390 |
| 818. 特願 2003-107647 | 868. 特願 2003-147820 |
| 819. 特願 2003-107885 | 869. 特願 2003-150690 |
| 820. 特願 2003-109575 | 870. 特願 2003-153014 |
| 821. 特願 2003-115750 | 871. 特願 2003-153015 |
| 822. 特願 2003-115793 | 872. 特願 2003-153016 |
| 823. 特願 2003-115847 | 873. 特願 2003-153985 |
| 824. 特願 2003-115888 | 874. 特願 2003-154009 |
| 825. 特願 2003-116232 | 875. 特願 2003-154841 |
| 826. 特願 2003-116895 | 876. 特願 2003-155397 |
| 827. 特願 2003-118161 | 877. 特願 2003-155407 |
| 828. 特願 2003-118186 | 878. 特願 2003-158017 |
| 829. 特願 2003-119749 | 879. 特願 2003-161005 |
| 830. 特願 2003-119930 | 880. 特願 2003-164126 |
| 831. 特願 2003-120934 | 881. 特願 2003-170051 |
| 832. 特願 2003-121233 | 882. 特願 2003-170324 |
| 833. 特願 2003-121261 | 883. 特願 2003-170325 |
| 834. 特願 2003-121273 | 884. 特願 2003-170326 |
| 835. 特願 2003-121780 | 885. 特願 2003-170327 |
| 836. 特願 2003-122245 | 886. 特願 2003-170328 |
| 837. 特願 2003-123984 | 887. 特願 2003-170329 |
| 838. 特願 2003-124654 | 888. 特願 2003-170330 |
| 839. 特願 2003-124655 | 889. 特願 2003-170573 |
| 840. 特願 2003-124826 | 890. 特願 2003-171576 |
| 841. 特願 2003-124829 | 891. 特願 2003-171619 |
| 842. 特願 2003-124833 | 892. 特願 2003-172898 |
| 843. 特願 2003-124835 | 893. 特願 2003-175819 |
| 844. 特願 2003-125388 | 894. 特願 2003-177298 |
| 845. 特願 2003-125403 | 895. 特願 2003-180198 |
| 846. 特願 2003-125405 | 896. 特願 2003-182958 |
| 847. 特願 2003-127090 | 897. 特願 2003-192763 |
| 848. 特願 2003-127093 | 898. 特願 2003-192775 |
| 849. 特願 2003-127109 | 899. 特願 2003-194837 |
| 850. 特願 2003-127130 | 900. 特願 2003-197229 |

目録(10)

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 901. 特願 2003-198340 | 951. 特願 2003-338191 |
| 902. 特願 2003-204075 | 952. 特願 2003-339542 |
| 903. 特願 2003-205349 | 953. 特願 2003-340181 |
| 904. 特願 2003-205710 | 954. 特願 2003-342519 |
| 905. 特願 2003-206546 | |
| 906. 特願 2003-207698 | |
| 907. 特願 2003-207771 | |
| 908. 特願 2003-207772 | |
| 909. 特願 2003-207850 | |
| 910. 特願 2003-270049 | |
| 911. 特願 2003-271473 | |
| 912. 特願 2003-272421 | |
| 913. 特願 2003-275055 | |
| 914. 特願 2003-277958 | |
| 915. 特願 2003-279130 | |
| 916. 特願 2003-283972 | |
| 917. 特願 2003-284055 | |
| 918. 特願 2003-286640 | |
| 919. 特願 2003-289138 | |
| 920. 特願 2003-293912 | |
| 921. 特願 2003-296474 | |
| 922. 特願 2003-298558 | |
| 923. 特願 2003-299424 | |
| 924. 特願 2003-303979 | |
| 925. 特願 2003-304452 | |
| 926. 特願 2003-304453 | |
| 927. 特願 2003-305689 | |
| 928. 特願 2003-305844 | |
| 929. 特願 2003-306137 | |
| 930. 特願 2003-307564 | |
| 931. 特願 2003-313014 | |
| 932. 特願 2003-315355 | |
| 933. 特願 2003-318801 | |
| 934. 特願 2003-321497 | |
| 935. 特願 2003-322948 | |
| 936. 特願 2003-324974 | |
| 937. 特願 2003-326510 | |
| 938. 特願 2003-327645 | |
| 939. 特願 2003-327907 | |
| 940. 特願 2003-328600 | |
| 941. 特願 2003-328840 | |
| 942. 特願 2003-330418 | |
| 943. 特願 2003-330569 | |
| 944. 特願 2003-331848 | |
| 945. 特願 2003-332756 | |
| 946. 特願 2003-333798 | |
| 947. 特願 2003-333932 | |
| 948. 特願 2003-334036 | |
| 949. 特願 2003-334083 | |
| 950. 特願 2003-336365 | |

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-330569
受付番号	20308550936
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成16年 3月16日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

特願 2003-330569

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

特願 2003-330569

出願人履歴情報

識別番号 [503359821]

1. 変更年月日	2003年10月 1日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	独立行政法人理化学研究所